

II

(Nezakonodavni akti)

UREDBE

UREDBA KOMISIJE (EU) 2019/1390

od 31. srpnja 2019.

o izmjeni Priloga Uredbi (EZ) br. 440/2008 o utvrđivanju ispitnih metoda u skladu s Uredbom (EZ) br. 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) radi prilagodbe tehničkom napretku

(Tekst značajan za EGP)

EUROPSKA KOMISIJA,

uzimajući u obzir Ugovor o funkcioniranju Europske unije,

uzimajući u obzir Uredbu (EZ) br. 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća od 18. prosinca 2006. o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) i osnivanju Europske agencije za kemikalije te o izmjeni Direktive 1999/45/EZ i stavljanju izvan snage Uredbe Vijeća (EEZ) br. 793/93 i Uredbe Komisije (EZ) br. 1488/94 kao i Direktive Vijeća 76/769/EEZ i direktiva Komisije 91/155/EEZ, 93/67/EEZ, 93/105/EZ i 2000/21/EZ ⁽¹⁾, a posebno njezin članak 13. stavak 2.,

budući da:

- (1) Uredba Komisije (EZ) br. 440/2008 ⁽²⁾ sadržava ispitne metode za potrebe određivanja fizikalno-kemijskih svojstava, toksičnosti i ekotoksičnosti kemikalija koje treba primijeniti za potrebe Uredbe (EZ) br. 1907/2006.
- (2) Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj (OECD) razvija usklađene i na međunarodnoj razini dogovorene smjernice za ispitivanje kemikalija u regulatorne svrhe. OECD redovito izdaje nove i revidirane smjernice za ispitivanje uzimajući u obzir znanstveni napredak u tom području.
- (3) Kako bi se uzeo u obzir tehnički napredak i, kad je god moguće, u skladu s člankom 13. stavkom 2. Uredbe (EZ) br. 1907/2006 smanjio broj životinja koje se koriste u eksperimentalne svrhe, nakon donošenja odgovarajućih smjernica OECD-a za ispitivanje trebalo bi utvrditi dvije nove ispitne metode za procjenu ekotoksičnosti i devet novih ispitnih metoda za utvrđivanje toksičnosti za ljudsko zdravlje te bi sedam ispitnih metoda trebalo ažurirati. Jedanaest od tih ispitnih metoda odnose se na *in vitro* ispitivanja nadraživanja/nagrizanja kože i oka, izazivanje osjetljivosti kože, genotoksičnost i endokrine učinke. S dionicima je provedeno savjetovanje o predloženoj izmjeni.

⁽¹⁾ SL L 396, 30.12.2006., str. 1.

⁽²⁾ Uredba Komisije (EZ) br. 440/2008 od 30. svibnja 2008. o utvrđivanju ispitnih metoda u skladu s Uredbom (EZ) br. 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) (SL L 142, 31.5.2008., str. 1.).

- (4) Uredbu (EZ) br. 440/2008 trebalo bi stoga na odgovarajući način izmijeniti.
- (5) Mjere predviđene ovom Uredbom u skladu su s mišljenjem odbora uspostavljenog na temelju članka 133. Uredbe (EZ) br. 1907/2006,

DONIJELA JE OVU UREDBU:

Članak 1.

Prilog Uredbi (EZ) br. 440/2008 mijenja se u skladu s Prilogom ovoj Uredbi.

Članak 2.

Ova Uredba stupa na snagu dvadesetog dana od dana objave u *Službenom listu Europske unije*.

Ova je Uredba u cijelosti obvezujuća i izravno se primjenjuje u svim državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 31. srpnja 2019.

Za Komisiju
Predsjednik
Jean-Claude JUNCKER

PRILOG

Prilog Uredbi (EZ) br. 440/2008 mijenja se kako slijedi:

(1) u dijelu B poglavlje B.4. zamjenjuje se sljedećim:

„B.4. AKUTNO NADRAŽIVANJE/NAGRIZANJE KOŽE

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 404 (TG) (2015.). Smjernice OECD-a za ispitivanje kemikalija periodički se preispituju kako bi se osiguralo da odražavaju najbolje dostupne znanstvene spoznaje. Kod preispitivanja Smjernice OECD-a za ispitivanje 404 posebna je pozornost posvećena mogućim poboljšanjima u vezi s dobrobiti životinja i procjeni svih postojećih informacija o ispitivanoj kemikaliji kako bi se izbjegla nepotrebna ispitivanja na laboratorijskim životinjama. Ažurirana verzija Smjernice OECD-a za ispitivanje 404 (izvorno donesena 1981., revidirana 1992., 2002. i 2015.) uključuje upućivanje na Smjernice o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nadraživanje/nagrizanje kože (1.), u kojima se predlaže modularan pristup ispitivanju nadraživanja i nagrizanja kože. U IATA-i je opisano nekoliko modula u kojima se grupiraju izvori informacija i alati za analizu te i. pružaju se smjernice o tome kako integrirati i upotrijebiti postojeće podatke o ispitivanju i podatke koji se dobivaju bez ispitivanja za procjenu potencijala kemikalija da uzrokuju nadraživanje i nagrizanje kože te ii. predlaže se pristup kad je potrebno daljnje ispitivanje (1.). Osim toga, u toj se smjernici, prema potrebi, kod početnog ispitivanja *in vivo* preporučuje postupna, a ne istodobna primjena triju ispitnih krpica (*patch test*) na životinju.
2. Definicije za nadraživanje i nagrizanje kože utvrđene su u Dodatku ovoj ispitnoj metodi.

POČETNA RAZMATRANJA

3. Kako bi se osigurala pouzdanost znanstvenih rezultata i dobrobit životinja, *in vivo* ispitivanje ne bi trebalo započeti sve dok se analizom snage dokaza ne ocijene svi raspoloživi podaci koji su relevantni za moguće nagrizajuće/nadražujuće djelovanje ispitivane kemikalije na kožu, kako je navedeno u Smjernicama o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni za nagrizanje i nadraživanje kože, tj. u trima dijelovima tih smjernica i njihovim odgovarajućim modulima (1.). Ukratko, u dijelu 1. postojeći se podaci razmatraju u sedam modula kojima su obuhvaćeni podaci dobiveni ispitivanjima na ljudima, podaci dobiveni metodom *in vivo*, podaci dobiveni metodom *in vitro*, podaci o fizikalno-kemijskim svojstvima (npr. pH-vrijednost, osobito jaka kiselost ili lužnatost) i metode koje ne uključuju ispitivanje. U dijelu 2. provodi se analiza snage dokaza. Ako analiza snage dokaza i dalje nije jednoznačna, trebao bi se provesti dio 3. s dodatnim ispitivanjem, pri čemu se počinje s *in vitro* metodama, a *in vivo* ispitivanja koriste se kao posljednja opcija. Ta bi analiza stoga trebala smanjiti potrebu za *in vivo* ispitivanjem nagrizajućeg/nadražujućeg djelovanja ispitivanih kemikalija na kožu za koje u pogledu te dvije krajnje točke već postoji dovoljno dokaza na temelju drugih istraživanja.

NAČELO IN VIVO ISPITIVANJA

4. Jedna doza ispitivane kemikalije nanosi se na kožu pokusne životinje; netretirani dijelovi kože ispitne životinje služe za kontrolu. Stupanj nadraženosti/nagriženosti očitava se i bilježi u određenim vremenskim intervalima i zatim se dodatno opisuje kako bi se mogla napraviti kompletna ocjena učinaka. Istraživanje treba trajati dovoljno dugo da bude moguće ocijeniti jesu li uočeni učinci reverzibilni ili ireverzibilni.
5. Životinje koje pokazuju stalne znakove jakog stresa i/ili boli u bilo kojoj fazi ispitivanja treba humano usmrtniti te ispitivanu kemikaliju s tim u skladu ocijeniti. Kriteriji za donošenje odluke o humanom usmrćivanju životinja koje su na umoru i koje jako pate navedeni su u zasebnom dokumentu sa smjernicama (2.).

PRIPREME ZA IN VIVO ISPITIVANJE

Odabir životinjske vrste

6. Kao pokusne životinje preporučuje se upotrijebiti albino kuniće, i to zdrave, mlade odrasle primjerke. U slučaju da se koristi neka druga životinjska vrsta, treba navesti razloge za to.

Priprema životinja

7. Otprilike 24 sata prije ispitivanja životinjama se s leđnog dijela trupa uklanja dlaka šišanjem neposredno uz kožu. Pritom treba paziti da se koža ne ošteti te treba koristiti samo životinje sa zdravom, netaknutom kožom.
8. Kod nekih su sojeva kunića određeni dijelovi kože prekriveni vrlo gustom dlakom, što je posebno izraženo u određeno doba godine. Na takvima se gusto obraslim dijelovima kože ispitivanja ne bi smjela obavljati.

Uvjeti smještaja i hranjenja

9. Životinje treba smjestiti pojedinačno. Kad su u pitanju kunići, temperatura prostorije u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 20 °C (± 3 °C). Iako bi relativna vlaga trebala biti najmanje 30 % te je poželjno da ne prijeđe 70 %, osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50–60 %. Rasvjeta bi trebala biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Kad je riječ o hranjenju, može se primjenjivati standardna hrana za laboratorijske životinje uz neograničene količine vode za piće.

ISPITNI POSTUPAK

Primjena ispitivane kemikalije

10. Ispitivanu kemikaliju treba nanijeti na malu površinu (približno 6 cm²) kože i prekriti gazenom krpicom koju treba pričvrstiti nenadražujućom ljepljivom trakom. U slučajevima kad izravno nanošenje nije moguće (npr. tekućine ili neke paste) ispitivanu kemikaliju prvo treba nanijeti na gazenu krpicu koja se zatim stavlja na kožu. Krpicu treba držati labavo u kontaktu s kožom s pomoću odgovarajućeg poluokluzivnog obloga tijekom cijelog razdoblja izlaganja. Ako se ispitivana kemikalija nanosi na krpicu, na kožu je treba pričvrstiti na takav način da se ostvari dobar kontakt između kemikalije i kože te da kemikalija bude jednoliko raspoređena po koži. Životinju treba spriječiti da dosegne krpicu te da kemikaliju unese u organizam gutanjem ili udisanjem.
11. Tekuće ispitivane kemikalije obično se koriste nerazrijeđene. Kad se ispituju krute tvari (koje mogu biti usitnjene u prah ako se smatra potrebnim), ispitivanu kemikaliju treba navlažiti najmanjom mogućom količinom vode (ili, prema potrebi, nekim drugim odgovarajućim nosačem) koja je dovoljna da omogući dobar kontakt s kožom. Kad se koriste drugi nosači, a ne voda, potencijalni utjecaj nosača na nadraženost kože izazvanu ispitivanom kemikalijom treba biti minimalan ili nikakav.
12. Na kraju razdoblja izlaganja, koje obično traje četiri sata, ostatke ispitivane kemikalije po mogućnosti treba ukloniti vodom ili odgovarajućim otapalom, ne mijenjajući nastao odgovor ili integritet površinskog sloja kože (epiderme).

Visina doze

13. Na pripremljeni dio kože nanosi se doza od 0,5 ml tvari u tekućem obliku ili 0,5 g u krutom obliku ili u obliku paste.

Početno ispitivanje (ispitivanje nadražujućih/nagrizajućih svojstava *in vivo* na jednoj životinji)

14. Ako se na temelju analize snage dokaza ili prethodnog *in vitro* ispitivanja utvrdi da je ispitivana kemikalija korozivna, nadražujuća ili nerazvrstana, daljnje *in vivo* ispitivanje obično nije potrebno. Međutim, u slučajevima u kojima se smatra da su potrebni dodatni podaci provodi se *in vivo* ispitivanje u kojem se prvo upotrebljava jedna životinja i primjenjuje se sljedeći pristup. Na kožu jedne životinje u slijedu se stavljaju najviše tri krpice. Prva se krpica uklanja nakon tri minute. Ako se na koži ne uoči jaka reakcija, na drugo se mjesto stavlja druga krpica koja se uklanja nakon jednog sata. Ako se na temelju opažanja u ovoj fazi može zaključiti da ne bi bilo nehumano produžiti izlaganje, stavlja se treća krpica koja se uklanja nakon četiri sata i utvrđuje stupanj odgovora.
15. Ako se nakon bilo kojeg od tri izlaganja u nizu opazi nagrizajuće djelovanje, ispitivanje se odmah prekida. Ako se nakon uklanjanja posljednje krpice ne uoči nagrizajuće djelovanje, životinja se opaža 14 dana, osim u slučaju da do nagrizanja dođe ranije.
16. U slučajevima kad se ne očekuje da će ispitivana kemikalija uzrokovati nagrizanje, ali da može biti nadražujuća, treba na jednu životinju staviti jednu krpicu i držati je četiri sata.

Potvrđni test (ispitivanje nadraživanja kože *in vivo* na dodatnim životinjama)

17. Ako se tijekom početnog ispitivanja ne opazi nagrizajući učinak, nadražujući ili negativan odgovor treba potvrditi ispitivanjem na najviše dvije dodatne životinje, od kojih na svaku treba primijeniti po jednu krpicu u trajanju od četiri sata. Ako se tijekom početnog ispitivanja opazi nadražujući učinak, potvrdno se ispitivanje može izvesti sekvencijski ili istodobnim izlaganjem dviju dodatnih životinja. U iznimnim slučajevima kod kojih se početno ispitivanje ne provodi, može se tretirati dvije ili tri životinje jednom krpicom koja se nakon četiri sata uklanja. Ako pri korištenju dviju životinja obje pokažu isti odgovor, daljnje ispitivanje nije potrebno. U suprotnom, ispitivanju se podvrgava i treća životinja. Dvosmislene odgovore ponekad treba ocijeniti ispitivanjem na dodatnim životinjama.

Razdoblje opažanja

18. Opažanje treba trajati dovoljno dugo da se u potpunosti može utvrditi reverzibilnost uočenih učinaka. Međutim, pokus treba prekinuti u bilo kojem trenutku ako životinja pokazuje trajne znakove jake boli ili stresa. Da bi se utvrdila reverzibilnost učinaka, životinje treba opažati do 14 dana nakon uklanjanja krpice. Ako se reverzibilnost utvrdi prije isteka 14 dana, pokus odmah treba prekinuti.

Klinička opažanja i stupnjevanje reakcija na koži

19. Sve životinje treba pregledati kako bi se vidjelo pokazuju li znakove crvenila kože (eritema) ili otekline (edema) i to nakon 60 minuta, a zatim nakon 24, 48 i 72 sata po skidanju krpice. Za početno ispitivanje na jednoj životinji mjesto ispitivanja pregledava se i odmah nakon uklanjanja krpice. Stupanj reakcije na koži utvrđuje se i bilježi prema stupnjevima opisanim u tablici u nastavku. Ako se na koži pojavi oštećenje koje se nakon 72 sata ne može definirati kao nadraženost ili nagriženost, možda će za utvrđivanje reverzibilnosti učinaka biti potrebno opažanje u trajanju od 14 dana. Uz opažanja povezana s nadraženosti kože treba detaljno opisati i zabilježiti sve lokalne toksične učinke, kao što je isušivanje kože, i sve sustavne štetne učinke (npr. klinički znakovi toksičnosti i promjene u tjelesnoj masi). U slučaju dvosmislenih odgovora trebalo bi razmotriti mogućnost histopatološkog pregleda.
20. Stupnjevanje odgovora na koži po svojoj je prirodi subjektivno. Da bi se poboljšala usklađenost u stupnjevanju odgovora na koži te da bi se u tom smislu pomoglo ispitnim laboratorijima i onima koji obavljaju opažanja i tumače rezultate, osoblje koje obavlja ta opažanja treba proći odgovarajuće osposobljavanje za primjenu sustava ocjenjivanja (vidjeti tablicu u nastavku). Od pomoći bi mogao biti ilustrirani priručnik za utvrđivanje stupnja nadraženosti i drugih lezija kože (3.).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

21. Rezultate istraživanja, koji obuhvaćaju sve stavke iz stavka 24., treba rezimirati u obliku tablice u konačnom izvješću o ispitivanju.

Ocjena rezultata

22. Pokazatelje nadraženosti kože treba ocijeniti ovisno o vrsti i stupnju lezija te o njihovoj reverzibilnosti ili ireverzibilnosti. Pojedinačni rezultati ne predstavljaju apsolutni standard za nadražujuća svojstva određenog ispitnog materijala, s obzirom na to da se ocjenjuju i drugi njegovi učinci. Umjesto toga, na pojedinačne rezultate treba gledati kao na referentne vrijednosti koje se ocjenjuju u kombinaciji sa svim ostalim opažanjima iz istraživanja.
23. Kod ocjenjivanja nadraženosti kože treba uzeti u obzir reverzibilnost lezija. Ako reakcije kao što su alopecija (ograničena površina), hiperkeratoza, hiperplazija i perutanje ostanu prisutne do kraja 14-dnevnog razdoblja opažanja, ispitivanu kemikaliju treba smatrati nadražujućom.

Izvješće o ispitivanju

24. Izvješće o ispitivanju mora sadržavati sljedeće informacije:

Razlozi za ispitivanje in vivo:

- analiza snage dokaza postojećih podataka dobivenih prethodnim ispitivanjima, uključujući rezultate dobivene primjenom strategije sekvencijskog ispitivanja,
- opis relevantnih podataka dobivenih ranijim ispitivanjima,
- podaci dobiveni u svakoj fazi primijenjene strategije ispitivanja,
- opis obavljenih *in vitro* ispitivanja, uključujući pojedinosti o postupcima i rezultate dobivene ispitivanjem ispitivanih/referentnih tvari,
- analiza snage dokaza radi provođenja istraživanja *in vivo*.

Ispitivana kemikalija:

- tvar s jednim sastojkom: kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi, itd.,
- tvar s više sastojaka, smjesa i tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi ili biološki materijali (UVCB): opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka,
- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- izvor, broj serije, ako su dostupni,
- tretiranje ispitivane kemikalije/kontrolne tvari prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),

- stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,
- uvjeti skladištenja.

Nosač:

- identifikacijska oznaka, koncentracija (prema potrebi), upotrijebljeni volumen,
- obrazloženje za odabir nosača.

Ispitne životinje:

- upotrijebljena vrsta/soj, razlozi za upotrebu drugih životinja umjesto albino kunića,
- broj životinja svakog spola,
- tjelesna masa pojedinačnih životinja na početku i na kraju ispitivanja,
- dob na početku istraživanja,
- podrijetlo životinja, uvjeti smještaja, prehrana itd.

Ispitni uvjeti:

- tehnika pripremanja mjesta na koje će se staviti krpica,
- pojedinosti o upotrijebljenim materijalima i tehnici stavljanja krpice,
- pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije, nanošenju i uklanjanju.

Rezultati:

- tablični prikaz stupnjeva nadražujućeg/nagrizajućeg odgovora za svaku životinju u svakoj vremenskoj točki u kojoj se provodi opažanje,
- opis svih uočenih lezija,
- detaljni opis vrste i stupnja uočene nadraženosti ili nagrizanja i svi histopatološki nalazi,
- opis drugih štetnih lokalnih (npr. isušivanje kože) i sustavnih učinaka koji se javljaju pored nadraživanja i nagrizanja kože.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

1. OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, studeni 1998.
3. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

Tablica

Utvrđivanje Stupnja Reakcije na Koži**Nastanak eritema i eshara (crvenila kože i krasta)**

Nema eritema	0
Lagano izraženi eritemi (jedva uočljivi).....	1
Dobro definirani eritemi	2
Srednje do jako izraženi eritemi	3
Jako izraženi eritemi (tamno crvenilo, poput boje govedine) uz stvaranje eshara koji sprečavaju utvrđivanje stupnja eritema.....	4

Najviši mogući stupanj: 4

Nastanak edema

Nema edema	0
Vrlo lagani edemi (jedva uočljivi).....	1
Lagani edemi (rubovi površine izdignuti i jasno definirani).....	2
Srednji edemi (izdignuti približno 1 mm).....	3
Jaki edemi (izdignuti više od 1 mm i šire se izvan površine izlaganja).....	4

Najviši mogući stupanj: 4

U slučaju dvosmislenih odgovora može se obaviti histopatološki pregled.

Dodatak

DEFINICIJE

Kemikalija je tvar ili smjesa.

Nadraživanje kože je uzrokovanje reverzibilnog oštećenja kože nakon primjene ispitivane kemikalije u trajanju do najviše četiri sata.

Nagrivanje kože je uzrokovanje ireverzibilnog oštećenja kože, odnosno vidljive nekroze koja kroz epidermu prodire u dermu nakon što je ispitivana kemikalija primjenjivana u trajanju do najviše četiri sata. Nagrivanje je obično popraćeno čirevima, krvarenjem, krvavim krastama, a do kraja razdoblja promatranja od 14 dana i promjenom boje zbog izbjeljivanja kože, potpunim gubitkom dlake na zahvaćenim dijelovima te ožiljcima. Za ocjenjivanje sumnjivih lezija treba razmotriti mogućnost histopatoloških pretraga.

Ispitivana kemikalija je svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.;"

(2) u dijelu B poglavlje B.17. zamjenjuje se sljedećim:

„B.17. IN VITRO ISPITIVANJA GENSKIH MUTACIJA STANICA SISAVACA UPOTREBOM GENA HPRT I XPRT

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara smjernici OECD-a za ispitivanje 476 (2016.). Ispitne metode periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak, promjene regulatornih potreba i dobrobit životinja. U trenutačnoj revidiranoj verziji ispitne metode B.17. uzima se u obzir gotovo 30 godina iskustva s ovim ispitivanjem te je ona rezultat razvoja posebne nove metode namijenjene *in vitro* ispitivanjima genskih mutacija stanica sisavaca upotrebom gena za timidin kinazu. Ispitna metoda B.17. dio je niza ispitnih metoda u području genetske toksikologije. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti (1.).
2. Svrha je *in vitro* ispitivanja genskih mutacija stanica sisavaca otkrivanje genskih mutacija induciranih kemikalijama. Stanične linije koje se upotrebljavaju u tim ispitivanjima mjere napredne mutacije na reporterskim genima, točnije na genu za endogenu hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferazu (Hprt kod stanica glodavaca, HPRT kod ljudskih stanica; u ovoj se ispitnoj metodi zajednički nazivaju gen Hprt i HPRT test) i transgenu za ksantin-gvanin-fosforibozil-transferazu (gpt) (dalje u tekstu „XPRT test”). Testovi mutacija HPRT i XPRT otkrivaju različite spektre genetskih pojava. Uz mutacije otkrivene HPRT testom (npr. supstitucije baznih parova, pomaci okvira očitavanja, manje delecije i insercije), autosomalna lokacija transgena gpt može omogućiti otkrivanje mutacija koje su rezultat velikih delecija i moguće mitotske rekombinacije koja nije otkrivena HPRT testom jer se gen Hprt nalazi na X-kromosomu (2., 3., 4., 5., 6. i 7.). XPRT se trenutačno upotrebljava manje nego HPRT test u regulatorne svrhe.
3. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

4. Ispitivanja koja se obavljaju *in vitro* obično zahtijevaju primjenu egzogenog izvora metaboličke aktivacije. Egzogenim sustavom metaboličke aktivacije ne oponašaju se u cijelosti *in vivo* uvjeti.
5. Trebalo bi voditi računa o tome da se izbjegnu uvjeti koji bi doveli do lažno pozitivnih rezultata (odnosno moguće interakcije s ispitnim sustavom) koji nisu uzrokovani izravnom interakcijom ispitivanih kemikalija i genetskog materijala stanice; takvi uvjeti uključuju promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti (8., 9. i 10.), interakciju s komponentama medija (11. i 12.) ili prekomjerne razine citotoksičnosti (13.). Citotoksičnost koja premašuje preporučene najviše razine citotoksičnosti, kako su definirane u stavku 19., smatra se prekomjernom za HPRT test.
6. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

NAČELO ISPITIVANJA

7. Mutirane stanice kod kojih nema aktivnosti enzima Hprt u HPRT testu ili aktivnosti enzima xprt u XPRT testu otporne su na citostatske učinke purin analognog 6-tiogvanina (TG). Stanice koje sadržavaju dosta Hprta (u HPRT testu) ili gpta (u XPRT testu) osjetljive su na TG, što uzrokuje inhibiciju staničnog metabolizma i sprečava daljnju diobu stanica. Tako se mutirane stanice uz prisutnost TG-a mogu razmnožavati, a normalne stanice koje sadržavaju enzim Hprt (u HPRT testu) ili gpt (u XPRT testu) ne mogu.

8. Stanice u suspenziji ili jednoslojnim kulturama izlažu se u odgovarajućem trajanju ispitivanoj kemikaliji (od tri sata do šest sati), s egzogenim izvorom metaboličke aktivacije i bez njega (vidjeti stavak 14.), te se zatim supkultiviraju da bi se utvrdila citotoksičnost i omogućila fenotipska ekspresija prije selekcije mutanata (14., 15., 16. i 17.). Citotoksičnost se utvrđuje relativnom stopom preživljavanja, tj. učinkovitošću kloniranja koja se mjeri odmah nakon tretiranja i prilagođava za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja u usporedbi s negativnom kontrolom (stavak 18. i Dodatak 2.). Tretirane se kulture drže u mediju za rast tijekom dovoljno dugog vremenskog razdoblja koje je karakteristično za svaki tip stanice, kako bi se omogućila gotovo optimalna fenotipska ekspresija induciranih mutacija (obično najmanje 7–9 dana). Nakon fenotipske ekspresije utvrđuje se učestalost pojave mutanata nasađivanjem poznatog broja stanica u medij koji sadržava selektivni agens za otkrivanje kolonija mutanata, a u medij bez selektivnog agensa za određivanje učinkovitosti kloniranja (vijabilnost). Nakon odgovarajućeg razdoblja inkubacije kolonije se prebroje. Učestalost pojave mutanata računa se na temelju broja kolonija mutanata koji se ispravlja učinkovitošću kloniranja u trenutku selekcije mutanata.

OPIS METODE

Pripreme

Stanice

9. Vrste stanica koje se koriste u testovima HPRT i XPRT trebale bi imati dokazanu osjetljivost na kemijske mutagene, visoku učinkovitost kloniranja, stabilan kariotip i stabilnu učestalost pojave spontanijih mutanata. Stanice koje se najčešće upotrebljavaju za HPRT test uključuju linije stanica kineskog hrčka CHO, CHL i V79, stanice limfoma miša L5178Y te stanice ljudskih limfoblastoidnih stanica TK6 (18. i 19.). Za XPRT test upotrebljavaju se stanice AS52 dobivene od stanica CHO koje sadržavaju transgen gpt (i kod kojih je izbrisan gen hprt) (20. i 21.); HPRT test ne može se provesti na stanicama AS52 jer je izbrisan gen hprt. Uporaba drugih staničnih linija trebala bi se opravdati i validirati.
10. Rutinski bi trebalo provjeravati stabilnost modalnog broja kromosoma staničnih linija te odsustvo kontaminacije mikoplazmom (22. i 23.), a stanice ne bi trebalo upotrebljavati ako su kontaminirane ili ako je promijenjen modalni broj kromosoma. Treba utvrditi uobičajeno trajanje staničnog ciklusa koje se upotrebljava u ispitnom laboratoriju i ono treba biti u skladu s objavljenim značajkama stanica. Trebalo bi provjeriti i učestalost pojave spontanijih mutanata u glavnoj zalihi stanica te zalihi ne bi trebalo upotrebljavati ako učestalost pojave mutanata nije prihvatljiva.
11. Prije upotrebe u ovom ispitivanju iz kultura će možda trebati odstraniti mutirane stanice koje već postoje, npr. uzgojem u HAT mediju za HPRT test i MPS mediju za XPRT test (5. i 24.) (vidjeti Dodatak 1.). Te pročišćene stanice mogu se krioprezervirati i zatim odmrznuti za uporabu kao radni uzorci. Radni uzorak koji se odmrzne može se upotrebljavati za ispitivanje nakon što se dosegne normalno vrijeme dupliciranja. Pri provedbi XPRT testa za rutinsku kulturu stanica AS52 trebali bi se primjenjivati uvjeti kojima se osigurava održavanje transgena gpt (20.).

Uvjeti koje moraju zadovoljavati podloge i kulture

12. Za održavanje kultura trebalo bi primjenjivati prikladne uvjete za medije za uzgoj kulture i uvjete inkubacije (posude za kulture, vlažne atmosferske uvjete od 5 % CO₂ i temperaturu inkubacije od 37 °C). Stanične kulture uvijek bi se trebale održavati u uvjetima kojima se osigurava da one rastu u logaritamskoj fazi. Posebno je važno odabrati uvjete medija i kultura kojima se osiguravaju optimalni rast stanica tijekom razdoblja ekspresije i optimalna učinkovitost kloniranja kako mutiranih tako i nemutiranih stanica.

Priprema kultura

13. Stanične linije razmnožavaju se iz matičnih kultura te se nasađuju u medij za uzgoj kulture takvom gustoćom da stanice u suspenziji ili jednoslojnoj kulturi nastave eksponencijalno rasti tijekom razdoblja tretiranja i ekspresije (npr. treba izbjeći konfluenciju kod stanica koje rastu kao jednoslojna kultura).

Metabolička aktivacija

14. Kod uporabe stanica s neodgovarajućom endogenom sposobnošću metabolizma trebalo bi upotrebljavati egzogene sustave metaboličkog djelovanja. Sustav koji se najčešće upotrebljava i automatski preporučuje, osim ako je drukčije opravdano, jest postmitohondrijska frakcija s dodanim kofaktorom (S9), pripravljena od jetre glodavaca (obično štakora), koja je bila tretirana sredstvima za enzimsku indukciju, kao što je Aroclor 1254 (25., 26., 27. i 28.), ili mješavinom fenobarbitala i β -naftoflavona (29., 30., 31. i 32.). Upotreba navedene smjese nije u suprotnosti sa Stockholmskom konvencijom o postojanim organskim onečišćujućim tvarima (33.) i dokazano je da je za indukciju oksidaza s miješanom funkcijom jednako učinkovita kao Aroclor 1254 (29. i 31.). Frakcija S9 obično se upotrebljava u koncentracijama u rasponu od 1 do 2 % (v/v), ali može se povećati na 10 % (v/v) u konačnom ispitnom mediju. Na odabir vrste i koncentracije upotrijebljenog egzogenog sustava metaboličke aktivacije ili metaboličkog pokretača može utjecati kategorija tvari koje se ispituju (34., 35. i 36.).

Priprema ispitivane kemikalije

15. Krute ispitivane kemikalije trebalo bi pripremiti u prikladnim otapalima i prema potrebi razrijediti prije tretiranja stanica (vidjeti stavak 16.). Tekuće ispitivane kemikalije mogu se dodati izravno u ispitni sustav i/ili razrijediti prije tretiranja ispitnog sustava. Plinovite ili hlapljive ispitivane kemikalije trebalo bi ispitivati nakon što se prikladno izmijene standardni protokoli, kao što je tretiranje u hermetički zatvorenim posudama za kulture (37. i 38.). Ispitivanu kemikaliju potrebno je pripremiti neposredno prije tretiranja, osim ako je prema podacima o stabilnosti prihvatljivo skladištenje.

ISPITNI UVJETI

Otapala

16. Otapalo bi trebalo odabrati tako da se optimizira topljivost ispitivanih kemikalija bez negativnih učinaka na provedbu ispitivanja, kao što su npr. promjena rasta stanica, učinak na integritet ispitivane kemikalije, reagiranje s posudama za kulture ili oštećenje sustava metaboličke aktivacije. Preporučuje se da se, kad je god moguće, prvo uzme u obzir upotreba vodenog otapala (ili medija za uzgoj kulture). Uobičajena su otapala, na primjer, voda i dimetil sulfoksid. Općenito, organska otapala ne bi trebala prelaziti 1 % (v/v), a vodena otapala (fiziološka otopina ili voda) ne bi trebala prelaziti 10 % (v/v) u mediju za završno tretiranje. Ako se upotrebljavaju neuobičajena otapala (npr. etanol ili aceton), potrebno je opravdati njihovu uporabu podacima iz kojih se vidi da su ta otapala kompatibilna s ispitivanim kemikalijama i ispitnim sustavom te da ne djeluju genotoksično pri upotrijebljenoj koncentraciji. Ako ne postoje ti popratni podaci, važno je dodati netretirane kontrole (vidjeti Dodatak 1.) kako bi se dokazalo da odabrano otapalo ne inducira štetne ili mutagene učinke.

Mjerenje citotoksičnosti i odabir koncentracija izlaganja

17. Pri utvrđivanju najviše koncentracije ispitivane kemikalije trebalo bi izbjegavati koncentracije koje imaju sposobnost izazivanja lažno pozitivnih odgovora, kao što su koncentracije koje izazivaju prekomjernu citotoksičnost (vidjeti stavak 20.), taloženje u mediju za uzgoj kulture (vidjeti stavak 21.) ili znatne promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti (vidjeti stavak 5.). Ako ispitivana kemikalija u trenutku dodavanja uzrokuje znatnu promjenu pH-vrijednosti medija, pH-vrijednost može se prilagoditi puferiranjem medija za završno tretiranje kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati te održali primjereni uvjeti za uzgoj kulture.
18. Odabir koncentracije temelji se na citotoksičnosti i drugim razmatranjima (vidjeti stavke 20.–22.). Iako ocjena citotoksičnosti u početnom ispitivanju može biti korisna za bolje određivanje koncentracija koje će se upotrebljavati u glavnom pokusu, početno ispitivanje nije potrebno. Čak i ako se provodi početna ocjena citotoksičnosti, i dalje je obvezno mjerenje citotoksičnosti za svaku kulturu u glavnom pokusu. Citotoksičnost bi se trebala ocjenjivati primjenom relativne stope preživljavanja, tj. učinkovitosti kloniranja stanica koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja, na temelju broja stanica, u usporedbi s prilagođenom učinkovitošću kloniranja u negativnim kontrolama (kojima se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %) (formulu vidjeti u Dodatku 2.).

19. Potrebno je ocijeniti najmanje četiri ispitne koncentracije (ne uključujući kontrolu s otapalom i pozitivnu kontrolu) koje ispunjavaju kriterije prihvatljivosti (odgovarajuća citotoksičnost, broj stanica itd.). Iako se preporučuje upotreba usporednih kultura, za svaku se ispitivanu koncentraciju može upotrijebiti samo jedna tretirana kultura ili više njezinih ponovljenih uzoraka. Rezultati dobiveni iz više neovisnih ponovljenih kultura pri određenoj koncentraciji trebali bi se navoditi odvojeno, ali mogu se objediniti radi analize podataka (17.). Za ispitivane kemikalije koje pokazuju malu ili nikakvu citotoksičnost uglavnom će biti prikladne približno dvostruke ili trostruke koncentracije. Ako se pojavi citotoksičnost, odabranim bi ispitnim koncentracijama trebalo obuhvatiti raspon od koncentracije koja uzrokuje citotoksičnost do koncentracija pri kojima je citotoksičnost umjerena, niska ili nepostojeća. Mnoge ispitivane kemikalije imaju oštre krivulje odgovora na koncentraciju te će za obuhvaćanje cijelog raspona citotoksičnosti ili detaljno istraživanje odnosa koncentracije i odgovora možda biti potrebno upotrijebiti bliže raspoređene koncentracije i više od četiri koncentracije, posebno u situacijama u kojima je potrebno ponavljanje pokusa (vidjeti stavak 43.). Upotreba više od četiri koncentracije može biti osobito važna kad se upotrebljava jedna kultura.
20. Ako se maksimalna koncentracija temelji na citotoksičnosti, najvećom koncentracijom trebala bi se nastojati ostvariti relativna stopa preživljavanja od 20 do 10 %. Trebalo bi s oprezom tumačiti pozitivne rezultate koji se nalaze samo pri relativnoj stopi preživljavanja od 10 % ili manjoj (stavak 43.).
21. Za slabo topljive ispitivane kemikalije koje nisu citotoksične pri koncentracijama nižima od najniže koncentracije pri kojoj kemikalija nije topljiva najviša bi analizirana koncentracija trebala dovesti do zamućenosti ili taloga vidljivog golim okom ili inverznim mikroskopom na kraju tretiranja ispitivanom kemikalijom. Čak i ako se citotoksičnost pojavi iznad najniže netopljive koncentracije, preporučuje se ispitivanje pri samo jednoj koncentraciji koja dovodi do zamućenja ili s vidljivim talogom jer lažni učinci mogu biti posljedica taloga. Pri koncentraciji zbog koje nastaje talog potrebno je osigurati da taj talog ne utječe na izvođenje ispitivanja. Može biti korisno odrediti topljivost u mediju za uzgoj kulture prije izvođenja pokusa.
22. Ako nisu zapaženi talog ili ograničavajuća citotoksičnost, najviša ispitna koncentracija trebala bi odgovarati najnižoj od sljedećih vrijednosti: 10 mM, 2 mg/ml ili 2 µl/ml (39. i 40.). Ako sastav ispitivane kemikalije nije definiran, npr. ako je riječ o tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složenim reakcijskim proizvodima ili biološkim materijalima (tj. kemijskim tvarima nepoznatog ili promjenjivog sastava ili UVCB tvarima) (41.), proizvodima ekstrahiranim iz okoliša itd., možda će trebati povećati najvišu koncentraciju (npr. 5 mg/ml), u odsustvu dovoljne citotoksičnosti, kako bi se povećala koncentracija svakog sastojka. Međutim, trebalo bi napomenuti da ti zahtjevi mogu biti drukčiji za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima (42.).

Kontrole

23. Kod svakog uvjeta pokusa potrebno je uključiti istodobne negativne kontrole (vidjeti stavak 16.) koje se sastoje samo od otapala u mediju za tretiranje i koje su tretirane na isti način kao kulture za tretiranje.
24. Istodobne pozitivne kontrole potrebne su za dokazivanje sposobnosti laboratorija za određivanje mutagena u uvjetima upotrijebljenog protokola ispitivanja i učinkovitosti egzogenog sustava metaboličke aktivacije ako je primjenjivo. Primjeri pozitivnih kontrola navedeni su u tablici 1. u nastavku. Ako je to opravdano, mogu se koristiti alternativne tvari za pozitivnu kontrolu. S obzirom na to da je *in vitro* ispitivanje genotoksičnosti na stanicama sisavaca u dostatnoj mjeri standardizirano, ispitivanja u kojima se upotrebljavaju tretiranja s egzogenom metaboličkom aktivacijom i bez nje mogu se provoditi upotrebom samo pozitivnih kontrola koje zahtijevaju metaboličku aktivaciju. U tom će slučaju taj jedan odgovor pozitivne kontrole dokazati djelovanje sustava metaboličke aktivacije i osjetljivost ispitnog sustava. Svaku pozitivnu kontrolu trebalo bi primijeniti pri jednoj ili više koncentracija za koje se očekuje da će dovesti do ponovljivih i zamjetnih povećanja u odnosu na pozadinu kako bi se dokazala osjetljivost ispitnog sustava, a odgovor ne bi trebala dovesti u pitanje citotoksičnost koja prelazi granične vrijednosti utvrđene u ispitnoj metodi (vidjeti stavak 20).

Tablica 1.

Referentne tvari preporučene za ocjenu osposobljenosti laboratorija i za odabir pozitivnih kontrola

Stanje metaboličke aktivacije	Lokus	Tvar i CAS br.
Odsutnost egzogene metaboličke aktivacije	<i>Hprt</i>	Etil metansulfonat [CAS br. 62-50-0] Etil nitrozoureja [CAS br. 759-73-9] 4-nitrokinolin-1-oksid [CAS br. 56-57-5]
	<i>xprt</i>	Streptonigrin [CAS br. 3930-19-6] Mitomicin C [CAS br. 50-07-7]
Prisutnost egzogene metaboličke aktivacije	<i>Hprt</i>	3-metilkolantren [CAS br. 56-49-5] 7,12-dimetilbenzantracen [CAS br. 57-97-6] Benzo[a]piren [CAS br. 50-32-8]
	<i>xprt</i>	Benzo[a]piren [CAS br. 50-32-8]

POSTUPAK**Tretiranje ispitivanom kemikalijom**

25. Stanice koje se razmnožavaju tretiraju se ispitivanom kemikalijom uz prisutnost i odsutnost sustava metaboličke aktivacije. Izlaganje treba trajati odgovarajuće vrijeme (obično je primjereno od tri do šest sati).
26. Minimalni broj stanica koje se koriste za svaku ispitnu kulturu (kontrolnu i tretiranu) u svakoj fazi ispitivanja trebao bi se temeljiti na učestalosti pojave spontanijih mutanata. Opća je smjernica tretirati i pasażirati dovoljno stanica kako bi se održalo deset spontanijih mutacija u svakoj kulturi u svim fazama ispitivanja (17.). Učestalost pojave spontanijih mutanata općenito iznosi od 5×10^{-6} do 20×10^{-6} . Kako bi se postigla učestalost pojave spontanijih mutanata od 5×10^{-6} i kako bi se održao dovoljan broj spontanijih mutacija (10 ili više) čak i za kulture koje se tretiraju pri koncentracijama koje uzrokuju 90-postotnu citotoksičnost tijekom tretiranja (relativna stopa preživljavanja od 10 %), bilo bi potrebno tretirati najmanje 20×10^6 stanica. Osim toga, mora se kultivirati dovoljan broj stanica (ali nikad manje od dva milijuna) tijekom razdoblja ekspresije i nasaditi radi selekcije mutanata (17.).

Vrijeme fenotipske ekspresije i mjerenje učestalosti pojave mutanata

27. Nakon razdoblja tretiranja stanice se kultiviraju kako bi se omogućila ekspresija fenotipa mutanata. Obično je dovoljno od sedam do devet dana da bi se omogućila gotovo optimalna fenotipska ekspresija novoinduciranih mutanata *Hprta* i *xprta* (43. i 44.). Tijekom tog razdoblja stanice se moraju redovno supkultivirati kako bi se održao ekspanzijski rast. Nakon fenotipske ekspresije stanice se ponovno nasađuju u medij sa selektivnim agensom (6-tiogvanin) odnosno bez njega kako bi se utvrdili broj mutanata odnosno učinkovitost kloniranja u trenutku selekcije. To nasađivanje može se provesti upotrebom zdjelica za jednoslojne kulture ili ploče s mikrojažicama za stanice u suspenziji. Za selekciju mutanata stanice bi trebalo nasaditi pri gustoći kojom se osigurava optimalna regeneracija mutanata (tj. izbjegava se metabolička suradnja) (17.). Ploče se inkubiraju tijekom odgovarajućeg vremenskog razdoblja za optimalan rast kolonije (npr. od sedam do 12 dana) i kolonije se prebrojavaju. Učestalost pojave mutanata računa se na temelju broja kolonija mutanata koji se ispravlja učinkovitošću kloniranja u trenutku selekcije mutanata (formule vidjeti u Dodatku 2.).

Osposobljenost laboratorija

28. Kako bi steklo dovoljno iskustva u izvođenju ispitivanja prije njegove rutinske primjene, laboratorij treba izvesti niz pokusa s referentnim pozitivnim tvarima koje djeluju putem različitih mehanizama (najmanje jedna aktivna s metaboličkom aktivacijom i jedna aktivna bez metaboličke aktivacije, odabrana s popisa tvari iz tablice 1.) te s različitim negativnim kontrolama (upotrebom različitih otapala/nosača). Odgovori pozitivnih i negativnih kontrola trebali bi biti u skladu s literaturom. To se ne primjenjuje na laboratorije koji već imaju iskustva, tj. one koji imaju bazu podataka o prijašnjim ispitivanjima kako je utvrđeno u stavcima od 30. do 33.
29. Odabir tvari za pozitivnu kontrolu (vidjeti tablicu 1. u stavku 25.) trebao bi se ispitati u odsutnosti i prisutnosti metaboličke aktivacije kako bi se dokazala osposobljenost za otkrivanje mutagenih kemikalija, za utvrđivanje učinkovitosti sustava metaboličke aktivacije i za dokazivanje primjerenosti uvjeta za rast stanica tijekom tretiranja, fenotipske ekspresije i selekcije mutanata te postupaka ocjenjivanja. Potrebno je izabrati raspon koncentracija odabranih tvari pri kojima će doći do ponovljivih povećanja u odnosu na pozadinske vrijednosti, koja su povezana s koncentracijom, kako bi se dokazala osjetljivost i dinamički raspon ispitnog sustava.

Podaci o prijašnjim kontrolama

30. Laboratorij bi trebao utvrditi:
- raspon i distribuciju prijašnjih pozitivnih kontrola,
 - raspon i distribuciju prijašnjih negativnih kontrola (netretirane kulture, kontrole s otapalom).
31. Pri prvom prikupljanju podataka za distribuciju prijašnjih negativnih kontrola istodobne negativne kontrole trebale bi biti u skladu s objavljenim podacima o kontrolama (22.). Kako se budu dodavali novi eksperimentalni podaci o distribuciji kontrola, istodobne negativne kontrole trebale bi u idealnom slučaju biti unutar kontrolnih granica od 95 % te distribucije (17., 45. i 46.).
32. Baza podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija trebala bi u početku obuhvaćati najmanje deset pokusa, ali bilo bi poželjno da se sastoji od najmanje 20 pokusa provedenih u usporedivim pokusnim uvjetima. Laboratoriji bi trebali primjenjivati metode za kontrolu kvalitete, kao što su kontrolni dijagrami (npr. C-dijagrami ili X-stupčasti dijagrami (47.)), kako bi utvrdili koliko su promjenjivi njihovi podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama te dokazali da je u njihovu laboratoriju metodologija „pod kontrolom” (46.). Daljnje preporuke o tome kako uspostaviti i upotrebljavati prijašnje podatke (npr. kriteriji za uključivanje podataka u prijašnje podatke i njihovo izuzimanje iz tih podataka te kriteriji prihvatljivosti za određeni pokus) nalaze se u literaturi (45.).
33. Podaci o negativnim kontrolama trebali bi se sastojati od podataka o učestalosti pojave mutanata u jednoj kulturi ili, po mogućnosti, u ponovljenim kulturama kako je opisano u stavku 23. Istodobne negativne kontrole u idealnom bi slučaju trebale biti unutar kontrolnih granica od 95 % distribucije prijašnjih podataka o negativnim kontrolama koji se nalaze u bazi podataka laboratorija (17., 45. i 46.). Ako se podaci o istodobnim negativnim kontrolama nalaze izvan kontrolnih granica od 95 %, mogu biti prihvatljivi za uključivanje u distribuciju prijašnjih kontrola pod uvjetom da ti podaci nisu ekstremne netipične vrijednosti te da postoje dokazi o tome da je ispitni sustav „pod kontrolom” (vidjeti prethodno navedeno) i da nema tehničke ili ljudske pogreške.
34. Svaku izmjenu pokusnog protokola trebalo bi razmotriti s obzirom na to je li u skladu s postojećim bazama podataka laboratorija o prijašnjim kontrolama. Svaka veća nesukladnost trebala bi dovesti do uspostave nove baze podataka o prijašnjim kontrolama.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Predstavljanje rezultata

35. Predstavljanje rezultata trebalo bi uključivati sve podatke koji su potrebni za izračun citotoksičnosti (izraženo kao relativna stopa preživljavanja). Podaci za tretirane i kontrolne kulture trebali bi uključivati broj stanica na kraju tretiranja, broj stanica nasađenih odmah nakon tretiranja i brojeve kolonija (ili broj jažica bez kolonija za metodu s mikrojažicama). Relativna stopa preživljavanja za svaku kulturu trebala bi se izraziti kao postotak u odnosu na istodobnu kontrolu s otapalom (definicije potražiti u Dodatku 1.).
36. Predstavljanje rezultata trebalo bi uključivati i sve podatke koji su potrebni za izračun učestalosti pojave mutanata. Podaci za tretirane i kontrolne kulture trebali bi uključivati: (1) broj stanica nasađenih sa selektivnim agensom i bez njega (kad se stanice nasađuju radi selekcije mutanata) i (2) broj izbrojanih kolonija (ili broj jažica bez kolonija za metodu s mikrojažicama) na pločama sa selektivnim agensom i bez njega. Učestalost pojave mutanata računa se na temelju broja kolonija mutanata (na pločama sa selektivnim agensom) koji se ispravljaju učinkovitošću kloniranja (s ploča bez selektivnog agensa). Učestalost pojave mutanata trebala bi se izraziti kao broj mutiranih stanica po milijunu vijabilnih stanica (definicije potražiti u Dodatku 1.).
37. Potrebno je navesti podatke o pojedinačnim kulturama. Osim toga, sve je podatke potrebno sažeto prikazati u obliku tablice.

Kriteriji prihvatljivosti

38. Prihvatljivost ispitivanja temelji se na sljedećim kriterijima:
- smatra se da je istodobnu negativnu kontrolu prihvatljivo dodati u bazu podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija kako je opisano u stavku 33.,
 - istodobne pozitivne kontrole (vidjeti stavak 24.) trebale bi inducirati odgovore koji su u skladu s odgovorima generiranim u bazi podataka o prijašnjim pozitivnim kontrolama i dovesti do statistički značajnog povećanja u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,
 - ispitana su dva pokusna uvjeta (tj. s metaboličkom aktivacijom i bez nje) osim ako je jedan doveo do pozitivnog rezultata (vidjeti stavak 25.),
 - odgovarajući broj stanica i koncentracija prikladan je za analizu (stavci 25., 26. i 19.),
 - kriteriji za odabir najviše koncentracije u skladu su s kriterijima opisanim u stavcima 20., 21. i 22.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

39. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom ako u bilo kojem od ispitanih pokusnih uvjeta:
- najmanje pri jednoj ispitnoj koncentraciji zapaženo je statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,
 - odgovarajući test trenda pokazuje da je povećanje povezano s koncentracijom,

- bilo koji od rezultata je izvan distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti stavak 33.).

Kad su ispunjeni svi ti uvjeti, smatra se da ispitivana kemikalija može inducirati genske mutacije u uzgojenim stanicama sisavaca u tom sustavu ispitivanja. Preporuke za najprikladnije statističke metode nalaze se u literaturi (46. i 48.).

40. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno negativnom ako u svim ispitanim pokusnim uvjetima:

- ni pri jednoj ispitnoj koncentraciji nije zapaženo statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,
- odgovarajući test trenda pokazuje da nema povećanja povezanog s koncentracijom,
- svi su rezultati u okviru distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti stavak 33.).

Tad se smatra da ispitivana kemikalija ne može inducirati genske mutacije u uzgojenim stanicama sisavaca u tom sustavu ispitivanja.

41. Jasan pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeravati.

42. Ako odgovor nije ni jasan pozitivan ni jasan negativan kako je prethodno opisano ili kako bi se pridonijelo utvrđivanju biološke relevantnosti rezultata, podatke bi trebalo ocjenjivati na temelju stručne prosudbe i/ili daljnjih istraživanja. Moglo bi biti korisno ponoviti pokus, eventualno u izmijenjenim pokusnim uvjetima (npr. razmak između koncentracija, drugi uvjeti metaboličke aktivacije (tj. koncentracija S9 ili podrijetlo S9)).

43. U rijetkim slučajevima, čak i nakon dodatnih istraživanja, skup podataka neće omogućiti donošenje zaključka o tome je li rezultat pozitivan ili negativan. Stoga bi se trebalo zaključiti da je odgovor na ispitivanu kemikaliju dvosmislen (tumači se da je jednako vjerojatno da je pozitivan ili negativan).

Izvješće o ispitivanju

44. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako su poznate,
- izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u mediju za uzgoj kulture u koji je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Otapalo:

- obrazloženje odabira otapala,
- postotak otapala u konačnom mediju za uzgoj kulture.

Stanice:

Za laboratorijske glavne kulture:

- vrsta, izvor staničnih linija,
- broj pasaža, ako je dostupan, i povijest laboratorija,
- kariotipna svojstva i/ili modalni broj kromosoma,
- metode održavanja staničnih kultura,
- odsustvo mikoplazme,
- vremena udvostručivanja stanica.

Ispitni uvjeti:

- obrazloženje za odabir koncentracija i broja kultura, uključujući npr. podatke o citotoksičnosti i ograničenja topljivosti,
- sastav medija, koncentracija CO₂, razina vlažnosti,
- koncentracija ispitivane kemikalije izražena kao konačna koncentracija u mediju za uzgoj kulture (npr. µg ili mg/ml ili mM medija za uzgoj kulture),

- koncentracija (i/ili volumen) otapala i ispitivane kemikalije koji su dodani mediju za uzgoj kulture,
- temperatura inkubacije,
- vrijeme inkubacije,
- trajanje tretiranja,
- gustoća stanica za vrijeme tretiranja,
- vrsta i sastav sustava metaboličke aktivacije (izvor S9, metoda pripreme mješavine S9, koncentracija ili volumen mješavine S9 i S9 u konačnom mediju za uzgoj kulture, kontrole kvalitete S9), tvari pozitivne i negativne kontrole, konačne koncentracije za svaki uvjet tretiranja,
- duljina razdoblja ekspresije (uključujući broj nasadenih stanica te režim uzgoja supkultura i dodavanja hranjivih tvari, ako je primjereno),
- identitet selektivnog agensa i njegova koncentracija,
- kriteriji prihvatljivosti ispitivanja,
- metode korištene za utvrđivanje broja vijabilnih i mutiranih stanica,
- metode mjerenja citotoksičnosti,
- sve dodatne informacije koje se odnose na citotoksičnost i upotrijebljenu metodu,
- trajanje inkubacije nakon nasađivanja,
- kriteriji prema kojima se istraživanje smatra pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim,
- metode upotrijebljene za određivanje pH-vrijednosti, osmolalnosti i taloženja.

Rezultati:

- broj tretiranih stanica i broj supkultiviranih stanica za svaku kulturu,
- mjerenja citotoksičnosti i druga opažanja, ako postoje,
- znakovi taloženja i vrijeme utvrđivanja,

- broj stanica nasadenih na selektivni i neselektivni medij,
- broj kolonija u neselektivnom mediju i broj otpornih kolonija u selektivnom mediju te povezana učestalost pojave mutanata,
- odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,
- podaci o istodobnim negativnim kontrolama (s otapalom) i pozitivnim kontrolama (koncentracije i otapala),
- podaci o prijašnjim negativnim kontrolama (s otapalom) i prijašnjim pozitivnim kontrolama, zajedno s rasponima, srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama, interval pouzdanosti (npr. 95 %) te broj podataka,
- statističke analize (za pojedinačne kulture i objedinjena ponavljanja ako je primjereno) i p-vrijednosti, ako postoje.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

1. OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Pariz.
2. Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.
3. Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., SAD, 61, 1306.–1312.
4. Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagen. Res.*, 4, 394.–403.
5. Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. *Mutation Res.*, 223, 121.–128.
6. Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, 235.–239.
7. Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. *Mutation Res.*, 196, 17.–36.
8. Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147.–204.

9. Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, 297.–305.
10. Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789.–886.
11. Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutation Res.*, 49, 439.–452.
12. Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634, 177.–183.
13. Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. *Mutation Res.*, 584, 1.–256.
14. Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutation Res.*, 189, 135.–141.
15. Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutation Res.*, 216, 9.–17.
16. Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133.–147.
17. Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. U: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, str. 66.–101.
18. Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 86, 193.–214.
19. Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, *Mutation Res.*, 85, 165.–175.
20. Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2gpt-Transformed Cells, *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1411.–1415.
21. Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. *Proc Natl Acad Sci.*, 83(24): 9616.–9620.

22. Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Rukopis u pripremi).
23. Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261.–287.
24. Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299.–305.
25. Natarajan A.T., Tate A.D., Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83.–90.
26. Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365.–373.
27. Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347.–364.
28. Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.
29. Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175.–177.
30. Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. U: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, str. 85.–88.
31. Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. Toxicol., 4, 55.–65.
32. Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51.–59.
33. UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Dostupno na: [<http://www.pops.int.html>].
34. Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147.–156.

35. O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. *Environ. Mol. Mutation.*, 4, 7.–18.
36. Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Mol. Mutation*, 4, 7.–18.
37. Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. U: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, str. 91.–103.
38. Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5, 795.–801.
39. OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj.
40. Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, *Environ. Mol. Mutation*, 54, 36.–43.
41. EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,
42. USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Dostupno na: [<https://federalregister.gov/a/2012-13774>].
43. O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguanine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), *Mutation, Res.*, 59, 109.–118.
44. Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. *Mutation, Res.*, 1335(2):121–8.
45. Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation, Res.*, 723, 87.–90.
46. OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. *Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199)*, Organisation for Economic Cooperation and Development, Pariz.
47. Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. U: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, str. 141.–154.
48. Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Mutageni supstitucije baznih parova: kemikalije koje uzrokuju supstituciju baznih parova u DNK-u.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Učinkovitost kloniranja: postotak stanica nasađenih pri malenoj gustoći koje mogu narasti u koloniju koja se može prebrojiti.

Koncentracije: znači konačne koncentracije ispitivane kemikalije u mediju za uzgoj kulture.

Citotoksičnost: za testove obuhvaćene ovom ispitnom metodom citotoksičnost se definira kao smanjenje relativne stope preživljavanja tretiranih stanica u odnosu na negativnu kontrolu (vidjeti poseban stavak).

Napredna mutacija: genska mutacija od roditeljskog tipa u mutantni oblik, koja uzrokuje promjenu ili gubitak enzimskog djelovanja ili funkcije kodiranog proteina.

Mutageni pomaka okvira očitavanja (*frameshift* mutageni): kemikalije koje uzrokuju adiciju ili deleciju jednog baznog para ili više njih u molekuli DNK.

Genotoksičnost: opći izraz kojim su obuhvaćene sve vrste oštećenja DNK ili kromosoma uključujući lomove DNK, adukte, premještanja, mutacije, aberacije kromosoma i aneuploidiju. Ne dovode sve vrste genotoksičnih učinaka do mutacija ili trajnog oštećenja kromosoma.

HAT medij: medij koji sadržava hipoksantin, aminopterin i timidin, koji se koristi za odstranjivanje Hprt mutanata.

Mitotska rekombinacija: rekombinacija između homolognih kromatida koja može dovesti do indukcije lomova oba lanca DNK ili gubitka heterozigotnosti, a do koje dolazi tijekom mitoze.

MPA medij: medij koji sadržava ksantin, adenin, timidin, aminopterin i mikofenolnu kiselinu, koji se koristi za odstranjivanje Xprt mutanata.

Mutagen: uzrokuje nasljednu promjenu slijeda (sljedova) parova baza DNK u genima ili strukture kromosoma (kromosomske aberacije).

Učestalost pojave mutanata (MF): broj uočenih mutantnih kolonija podijeljen brojem stanica nasađenih u selektivni medij, koji se ispravlja učinkovitošću kloniranja (ili vijabilnosti) u trenutku selekcije.

Vrijeme fenotipske ekspresije: vrijeme nakon tretiranja tijekom kojeg se genetske modifikacije fiksiraju unutar genoma i postojeći genski produkti odstranjuju do te mjere da se mijenja fenotipsko svojstvo.

Relativna stopa preživljavanja (RS): relativna stopa preživljavanja upotrebljava se kao mjera citotoksičnosti povezane s tretiranjem. Relativna stopa preživljavanja je učinkovitost kloniranja stanica koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja, u usporedbi s učinkovitošću kloniranja u negativnim kontrolama (kojima se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %).

Frakcije jetre S9: supernatant homogenata jetre centrifugiran na 9 000 g, tj. ekstrakt sirove jetre.

Mješavina S9: mješavina frakcije jetre S9 i kofaktora potrebnih za djelovanje metaboličkih enzima.

Kontrola s otapalom: opći izraz za označivanje kontrolnih kultura kojima je dodano jedino otapalo koje je upotrijebljeno za otapanje ispitivane kemikalije.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Netretirana kontrola: kulture koje nisu ni s čim tretirane (tj. ni ispitivanom kemikalijom ni otapalom), ali se obrađuju istodobno i na isti način kao kulture tretirane ispitivanom kemikalijom.

UVCB: kemijske tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Dodatak 2.

FORMULE ZA PROCJENU CITOTOKSIČNOSTI I UČESTALOSTI POJAVE MUTANATA

Citotoksičnost se ocjenjuje relativnom stopom preživljavanja, tj. učinkovitošću kloniranja stanica koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja, u usporedbi s prilagođenom učinkovitošću kloniranja u negativnim kontrolama (kojima se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %) (vidjeti formulu za relativnu stopu preživljavanja u nastavku).

Prilagođena učinkovitost kloniranja za kulturu tretiranu ispitivanom kemikalijom računa se na sljedeći način:

$$\text{Prilagođeni CE} = \frac{\text{broj stanica na kraju tretiranja}}{\text{broj stanica na početku tretiranja}}$$

Relativna stopa preživljavanja za kulturu tretiranu ispitivanom kemikalijom računa se na sljedeći način:

$$\text{RS} = \frac{\text{prilagođeni CE u tretiranoj kulturi}}{\text{prilagođeni CE u kontroli s otapalom}} \times 100$$

Učestalost pojave mutanata je učinkovitost kloniranja kolonija mutanata u selektivnom mediju podijeljeno učinkovitošću kloniranja u neselektivnom mediju koja se mjeri za istu kulturu u trenutku selekcije.

$$\text{Učestalost pojave mutanata} = \frac{\text{učinkovitost kloniranja kolonija mutanata u selektivnom mediju}}{\text{učinkovitost kloniranja u neselektivnom mediju}}$$

Kad se za učinkovitost kloniranja upotrebljavaju ploče:

CE (učinkovitost kloniranja) = broj kolonija / broj nasađenih stanica.

Kad se za učinkovitost kloniranja upotrebljavaju ploče s mikrojažicama:

broj kolonija po jažici na pločama s mikrojažicama slijedi Poissonovu distribuciju,

učinkovitost kloniranja = $-\text{LnP}(0)$ / broj nasađenih stanica po jažici,

pri čemu je $-\text{LnP}(0)$ vjerojatan broj praznih jažica od jažica u koje su nasađene stanice i dobiva se sljedećom formulom:

$\text{LnP}(0) = -\text{Ln} (\text{broj praznih jažica} / \text{broj jažica u koje su nasađene stanice});$

(3) u dijelu B poglavlje B.22. zamjenjuje se sljedećim:

„B.22. ISPITIVANJE DOMINANTNIH LETALNIH GENA NA GLODAVCIMA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 478 (2016.). Ispitne metode periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak, promjene regulatornih potreba i razmatranja o dobrobiti životinja. U ovoj izmijenjenoj verziji ispitne metode uzima se u obzir više od trideset godina iskustva s tim ispitivanjem i mogućnost integriranja ili kombiniranja tog ispitivanja s drugim ispitivanjima toksičnosti kao što su razvojne studije ili studije reproduktivne toksičnosti ili genotoksičnosti; međutim, zbog njegovih ograničenja i upotrebe velikog broja životinja, ovo ispitivanje nije namijenjeno za upotrebu kao primarna metoda, već kao dodatna ispitna metoda koja se može upotrebljavati samo ako ne postoji alternativa za regulatorne zahtjeve. Kombiniranjem ispitivanja toksičnosti stvara se mogućnost da se u ispitivanjima toksičnosti ne upotrijebi mnogo životinja. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti (1.).
2. Svrha je ispitivanja dominantnih letalnih gena ispitati uzrokuju li kemikalije mutacije koje su posljedica kromosomskih aberacija zametnih stanica. Osim toga, ispitivanje dominantnih letalnih gena relevantno je za ocjenu genotoksičnosti jer, iako se mogu razlikovati među vrstama, faktori *in vivo* metabolizma, farmakokinetika i procesi popravka DNK aktivni su i pridonose odgovorima. Indukcija mutacije dominantnih letalnih gena nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji ukazuje na činjenicu da je kemikalija djelovala na zametno tkivo ispitne životinje.
3. Mutacije dominantnih letalnih gena uzrokuju embrionalnu ili fetalnu smrt. Indukcija mutacije dominantnih letalnih gena nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji ukazuje na činjenicu da je kemikalija djelovala na zametne stanice ispitne životinje.
4. Test dominantnih letalnih gena koristan je kao potvrda pozitivnih rezultata ispitivanja u kojima se upotrebljavaju somatske *in vivo* krajnje točke te je relevantna krajnja točka za predviđanje rizika po ljude i rizika od genetskih bolesti koje se prenose zametnom lozom. Međutim, za taj je test potrebno mnogo životinja i sati rada; stoga je i vrlo skup te dugo traje. Budući da je spontana učestalost mutacija dominantnih letalnih gena prilično velika, osjetljivost testa za otkrivanje malih povećanja učestalosti mutacija općenito je ograničena.
5. Definicije ključnih pojmova utvrđene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA

6. Ispitivanje se najčešće provodi na miševima (2., 3. i 4.), ali u određenim slučajevima mogu biti primjerene i druge vrste, kao što su štakori (5., 6., 7. i 8.), ako je to znanstveno opravdano. Dominantni letalni geni obično su rezultat velikih kromosomskih aberacija (strukturnih i numeričkih abnormalnosti) (9., 10. i 11.), ali ne mogu se isključiti genske mutacije. Mutacija dominantnih letalnih gena je mutacija do koje dolazi u zametnoj stanici automatski ili se fiksira nakon oplodnje u ranoj fazi embrija, a ne uzrokuje disfunkciju gamete, ali je smrtonosna za oplodeno jajašce ili embrij u razvoju.
7. Svaki se mužjak u odgovarajućim vremenskim intervalima uzastopno pari sa ženkama koje se prethodno nisu parile. Broj parenja nakon tretiranja ovisi o krajnjoj svrsi istraživanja dominantnih letalnih gena (stavak 23.) i trebao bi osigurati da se sve faze sazrijevanja zametnih stanica mužjaka ocijene u pogledu dominantnih letalnih gena (12.).
8. Ako postoje dokazi da ispitivana kemikalija ili njezini metaboliti neće dospjeti do sjemenika, ovaj oblik ispitivanja nije prikladan.

NAČELO ISPITIVANJA

9. Obično se mužjaci izlažu ispitivanoj kemikaliji prikladnim načinom izlaganja te se pare s netretiranim ženka koje se prethodno nisu parile. Različite vrste zametnih stanica mogu se ispitati primjenom uzastopnih intervala parenja. Nakon parenja ženke se nakon odgovarajućeg razdoblja eutanaziraju i njihove se maternice pregledavaju kako bi se utvrdio broj implantata te živih i mrtvih embrija. Dominantno letalno djelovanje ispitivane kemikalije utvrđuje se usporedbom živih implantata po ženki u tretiranoj skupini sa živim implantatima po ženki u kontrolnoj skupini s nosačem/otapalom. Povećanje broja mrtvih implantata po ženki u tretiranoj skupini u odnosu na broj mrtvih implantata po ženki u kontrolnoj skupini odražava postimplantacijski gubitak induciran ispitivanom kemikalijom. Postimplantacijski gubitak računa se utvrđivanjem omjera mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj u tretiranoj skupini u usporedbi s omjerom mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj u kontrolnoj skupini. Predimplantacijski gubitak može se procijeniti usporedbom broja žutih tijela umanjenog za ukupan broj implantata ili ukupnog broja implantata po ženki u tretiranoj i kontrolnoj skupini.

PROVJERA OSPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

10. Osposobljenost za provedbu ovog ispitivanja trebalo bi utvrditi dokazivanjem sposobnosti reproduciranja učestalosti pojave mutacija dominantnih letalnih gena na temelju objavljenih podataka (npr. 13., 14., 15., 16., 17. i 18.) s tvarima za pozitivnu kontrolu (uključujući slabe odgovore) kao što su one navedene u tablici 1., i kontrolama s nosačem te postizanja učestalosti u negativnim kontrolama koje su u skladu s prihvatljivim rasponom podataka (vidjeti prethodna upućivanja) ili distribucijom prijašnjih kontrola laboratorija, ako su dostupni.

OPIS METODE

Pripreme*Odabir životinjske vrste*

11. Trebalo bi upotrebljavati zdrave, spolno zrele životinje sojeva koji se obično upotrebljavaju u laboratorijskim istraživanjima. Obično se upotrebljavaju miševi, iako i štakori mogu biti prikladan odabir. Moguća je uporaba bilo koje druge prikladne vrste sisavaca ako je to znanstveno opravdano u izvješću.

Uvjeti smještaja i hranjenja životinja

12. U slučaju glodavaca, temperatura prostorije u kojoj se drže životinje trebala bi biti 22 °C (± 3 °C). Iako bi u idealnim okolnostima relativna vlažnost trebala biti 50–60 %, ona bi trebala biti najmanje 40 %, a poželjno je da ne prelazi 70 %, osim tijekom čišćenja prostorije. Rasvjeta bi trebala biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može upotrebljavati konvencionalna laboratorijska hrana uz neograničenu količinu vode za piće. Kad se ispitivana kemikalija primjenjuje ovim načinom izlaganja, na izbor prehrane može utjecati potreba da se osigura odgovarajuća primjesa ispitivane kemikalije. Prije tretiranja ili parenja glodavce bi trebalo držati u malim skupinama (najviše pet) istog spola ako se ne očekuje ili ne opazi agresivno ponašanje, po mogućnosti u čvrstim kavezima s primjereno obogaćenim okolišem. Ako je to znanstveno opravdano, životinje se mogu držati u zasebnim nastambama.

Priprema životinja

13. Zdrave, spolno zrele mužjake i ženke nasumce se raspoređuje u kontrolne skupine i skupine za tretiranje. Pojedinačne životinje označuju se na jedinstven način upotrebom humane, najmanje invazivne metode (npr. prstenovanjem, stavljanjem oznaka, mikročipiranjem ili biometrijskom identifikacijom, ali ne rezanjem prsta i uha) i prilagođavaju laboratorijskim uvjetima najmanje pet dana. Kaveze bi trebalo rasporediti tako da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Trebalo bi izbjegavati unakrsnu kontaminaciju pozitivnom kontrolom i ispitivanom kemikalijom. Na početku istraživanja razlike u tjelesnoj masi životinja trebale bi biti minimalne i ne bi trebale prelaziti ± 20 % srednje vrijednosti mase svakog spola.

Priprema doza

14. Prije nego što se doza daje životinjama, krute ispitivane tvari po potrebi treba otopiti ili suspendirati u odgovarajućim otapalima ili nosačima ili dodati hrani ili vodi za piće. Tekuće ispitivane kemikalije mogu se dozirati izravno ili razrijediti prije doziranja. Za potrebe inhaliranja, ispitivane kemikalije mogu se primijeniti u obliku plina, pare ili krutog/tekućeg aerosola, ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima. Ako prema podacima o stabilnosti skladištenje nije prihvatljivo i ako nisu utvrđeni prikladni uvjeti skladištenja, preparate ispitivane kemikalije trebalo bi upotrebljavati svježe.

Ispitni uvjeti*Otapalo/nosač*

15. Pri upotrijebljenom volumenu doze otapalo/nosač ne smije imati toksične učinke i ne smije postojati sumnja da bi mogao kemijski reagirati s ispitivanom tvari. Ako se upotrebljavaju otapala/nosači koji nisu dobro poznati, njihovo uključivanje u ispitivanje trebalo bi potkrijepiti referentnim podacima kojima se dokazuje njihova usklađenost. Kad je god moguće, preporučuje se najprije razmotriti mogućnost primjene vodenog otapala/nosača. Primjeri uobičajeno korištenih usklađenih otapala/nosača uključuju vodu, fiziološku otopinu, otopinu metil-celuloze, otopinu natrijeve soli karboksimetilne celuloze, maslinovo ulje i kukuruzno ulje.

Pozitivne kontrole

16. Uvijek bi se trebale upotrebljavati životinje istodobnih pozitivnih kontrola, osim ako je laboratorij dokazao osposobljenost za provedbu ispitivanja te je u nedavnoj prošlosti rutinski upotrebljavao ispitivanje (npr. u posljednjih pet godina). Međutim, životinje pozitivnih kontrola nije potrebno tretirati istim putem izlaganja kao životinje koje primaju ispitivanu kemikaliju ili uzimati uzorke u svim intervalima parenja. Za tvari za pozitivnu kontrolu trebalo bi biti poznato da proizvode dominantne letalne gene u uvjetima koji se upotrebljavaju za ispitivanje. Izuzimajući tretiranje, sa životinjama u kontrolnim skupinama treba postupati jednako kao sa životinjama u tretiranim skupinama.
17. Doze tvari za pozitivnu kontrolu trebale bi se odabrati tako da proizvode slabe ili umjerene učinke kojima se kritički procjenjuju uspješnost i osjetljivost ispitivanja, ali da dosljedno dovode do pozitivnih dominantno letalnih učinaka. Primjeri tvari za pozitivnu kontrolu i primjerene doze navedeni su u tablici 1.

Tablica 1.

Primjeri tvari za pozitivnu kontrolu

Tvar [CAS br.] (referentni br.)	Raspon učinkovitih doza (mg/kg) (vrsta glodavca)	Trajanje primjene (u danima)
Trietenmelamin [51-18-3] (15.)	0,25 (miševi)	1
Ciklofosamid [50-18-0] (19.)	50–150 (miševi)	5
Ciklofosamid [50-18-0] (5.)	25–100 (štakori)	1
Etil metansulfonat [62-50-0] (13.)	100–300 (miševi)	5
Monomerni akrilamid [79-06-1] (17.)	50 (miševi)	5
Klorambucil [305-03-3] (14.)	25 (miševi)	1

Negativne kontrole

18. Životinje negativne kontrole, koje se tretiraju samo s otapalom ili nosačem i koje su osim toga tretirane na jednak način kao i skupine za tretiranje, trebale bi biti uključene u svako vrijeme uzorkovanja (20.). Ako ne postoje prijašnji ili objavljeni kontrolni podaci kojima se dokazuje da odabrano otapalo ili nosač ne inducira dominantne letalne gene ili druge štetne učinke, netretirane kontrolne životinje također bi trebale biti uključene u svako vrijeme uzorkovanja kako bi se utvrdila prihvatljivost kontrole s nosačem.

POSTUPAK

Broj životinja

19. Svaki se mužjak u odgovarajućim unaprijed utvrđenim vremenskim intervalima (npr. u tjednim intervalima, stavci 21. i 23.) uzastopno pari, po mogućnosti s jednom ženkom koja se prethodno nije parila. Broj mužjaka po skupini treba unaprijed utvrditi kako bi bio dovoljan (u kombinaciji s brojem parenih ženki u svakom intervalu parenja) za osiguravanje statističke snage potrebne kako bi se otkrilo barem udvostručenje učestalosti pojave dominantnih letalnih gena (stavak 44.)
20. Broj ženki po intervalu parenja isto treba unaprijed utvrditi izračunima statističke snage kako bi se omogućilo otkrivanje barem udvostručenja učestalosti pojave dominantnih letalnih gena (tj. dovoljan broj gravidnih ženki kako bi se ukupno dobilo najmanje 400 implantata) (20., 21., 22. i 23.) i tako da se očekuje najmanje jedan mrtvi implantat po jedinici analize (tj. skupini parenja po dozi) (24.).

Razdoblje primjene i intervali parenja

21. Broj intervala parenja koji slijedi nakon tretiranja određen je režimom tretiranja i trebao bi osigurati ocjenjivanje svih faza sazrijevanja zametnih stanica mužjaka u pogledu induciranja dominantnih letalnih gena (12. i 25.). Kod jednog tretiranja u kojem se primjenjuje do pet dnevnih doza trebalo bi provesti osam (miševi) ili deset (štakori) parenja u tjednim intervalima nakon posljednjeg tretiranja. Kod primjene više doza broj intervala parenja može se smanjiti razmjerno produljenju razdoblja primjene, ali tako da se zadrži cilj ocjenjivanja svih faza spermatogeneze (npr. kod miševa su nakon 28-dnevnog izlaganja dovoljna samo četiri tjedna parenja kako bi se ocijenile sve faze spermatogeneze). Svi režimi tretiranja i parenja trebali bi biti znanstveno opravdani.
22. Ženke bi trebale ostati s mužjacima barem tijekom jednog ciklusa estrusa (npr. kod miševa i štakora jedan tjedan obuhvaća jedan ciklus estrusa). Ženke koje se nisu parile tijekom jednog intervala mogu se upotrijebiti za sljedeći interval parenja. Ili dok ne dođe do parenja, što se utvrđuje na temelju prisutnosti sperme u vagini ili na temelju prisutnosti vaginalnog čepa.
23. Izlaganje i režim parenja koji se primjenjuju ovise o krajnjoj svrsi istraživanja dominantne letalnosti. Ako je cilj utvrditi inducira li određena kemikalija mutacije dominantnih letalnih gena automatski, tad bi prihvatljiva metoda bila izlaganje cijelog ciklusa spermatogeneze (npr. sedam tjedana kod miševa, 5–7 tretiranja tjedno) i jedno parenje na kraju ciklusa. Međutim, ako je cilj utvrditi vrstu zametnih stanica osjetljivu na induciranje dominantnih letalnih gena, prednost se daje jednom ili petodnevnom izlaganju nakon kojeg slijedi tjedno parenje.

Visine doza

24. Ako se provodi preliminarno istraživanje za određivanje raspona jer još nisu dostupni prikladni podaci koji bi pomogli u odabiru doza, trebalo bi ga provesti u istom laboratoriju primjenom iste vrste, soja, spola i režima tretiranja kao i u glavnom istraživanju (26.). Istraživanjem bi se trebala odrediti maksimalna podnošljiva doza (MTD), koja je definirana kao najviša doza koja će se podnijeti bez dokaza o toksičnosti ograničene istraživanjem, povezane s trajanjem istraživanja (na primjer, neuobičajeno ponašanje ili reakcije, manji gubitak tjelesne mase ili hematopoetska sustavna citotoksičnost), isključujući smrt ili dokaze o boli, patnji ili stresu zbog kojih se zahtijeva humana eutanazija (27.).

25. Maksimalna podnošljiva doza ne smije negativno utjecati ni na uspjeh parenja (21.).
26. Ispitivane kemikalije s posebnim biološkim djelovanjem u slabim netoksičnim dozama (kao što su hormoni i mitogeni) i kemikalije koje pokazuju zasićenost toksikokinetičkih svojstava mogu se izuzeti iz kriterija u pogledu određivanja doza i trebale bi se procjenjivati od slučaja do slučaja.
27. Kako bi se dobile informacije o odgovoru na dozu, potpuno istraživanje trebalo bi uključivati negativnu kontrolnu skupinu i minimalno tri visine doze pri čemu je svaka uglavnom dvostruko veća od prethodne, ali najviše četverostruko. Ako ispitivana kemikalija u istraživanju za određivanje raspona ili na temelju postojećih podataka ne izaziva toksičnost, najviša doza za jednu primjenu trebala bi biti 2 000 mg/kg tjelesne mase. Međutim, ako ispitivana kemikalija uzrokuje toksičnost, MTD bi trebao biti najviša primijenjena doza i poželjno je da se primijenjenim visinama doze obuhvati raspon od maksimalne doze do doze koja izaziva malu toksičnost ili ne izaziva toksičnost. Za netoksične kemikalije granična doza za razdoblje primjene od 14 dana ili više iznosi 1 000 mg/kg tjelesne mase dnevno, a za razdoblja primjene kraća od 14 dana granična doza iznosi 2 000 mg/kg tjelesne mase dnevno.

Primjena doza

28. Pri planiranju testa u obzir bi trebalo uzeti očekivani način izlaganja kod ljudi. Stoga se, ako je to opravdano, mogu odabrati načini izlaganja kao što su unos s hranom, unos s vodom za piće, potkožna primjena, intravenozna primjena, lokalna primjena, inhalacija, oralna primjena (oralna intubacija) ili implantacija. U svakom slučaju, način izlaganja trebalo bi odabrati tako da se osigura prikladno izlaganje ciljnog tkiva. Intra-peritonealna injekcija obično se ne preporučuje jer nije način izlaganja namijenjen ljudima i trebalo bi je upotrebljavati samo uz posebno znanstveno opravdanje. Ako se ispitivana kemikalija dodaje hrani ili vodi za piće, posebno u slučaju primjene jedne doze, trebalo bi voditi računa o tome da se osigura dostatno vrijeme od unosa hrane i vode do parenja kako bi se omogućilo otkrivanje učinaka (stavak 31.). Maksimalni volumen tekućine koji se odjednom može primijeniti oralnom intubacijom ili injekcijom ovisi o veličini ispitne životinje. Taj volumen obično ne bi trebao biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim u slučaju vodenih otopina kod kojih je dopušteno upotrijebiti maksimalno 2 ml/100 g. Primjene većih volumena od navedenog (ako je dopušteno zakonodavstvom o dobrobiti životinja) treba opravdati. Variranje ispitnih volumena treba svesti na minimum podešavanjem koncentracije kako bi se kod svih visina doza osigurao stalni volumen u odnosu na tjelesnu masu.

Opažanja

29. Najmanje jednom dnevno treba provoditi opća klinička opažanja o ispitnim životinjama i zabilježiti kliničke znakove, po mogućnosti svaki dan u isto vrijeme ili vremena, vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih učinaka nakon doziranja. Najmanje dvaput dnevno tijekom razdoblja primjene doze, kod svih životinja treba provjeriti ima li slučajeva morbiditeta ili smrtnosti. Sve bi životinje trebalo izvagati na početku istraživanja i najmanje jednom tjedno tijekom istraživanja s ponovljenim dozama te prilikom eutanazije. Unos hrane treba mjeriti najmanje jednom tjedno. Ako se ispitivana kemikalija daje s vodom za piće, unos vode trebalo bi mjeriti pri svakoj promjeni vode i najmanje jednom tjedno. Životinje koje pokazuju nesmrtonosne pokazatelje prekomjerne toksičnosti trebalo bi eutanazirati prije dovršetka razdoblja ispitivanja (27.).

Prikupljanje i obrada tkiva

30. Ženke se eutanaziraju u drugoj polovini gravidnosti, na 13. dan gestacije kod miševa i 14.–15. dan kod štakora. Maternice se pregledavaju s obzirom na dominantno letalne učinke kako bi se utvrdio broj implantata, živih i mrtvih embrija te žutih tijela.
31. Rog maternice i jajnici izlažu se kako bi se prebrojala žuta tijela, a fetusi se uklanjaju, broje i važu. Trebalo bi oprezno pregledati maternice kako bi se otkrile resorpcije koje mogu prikriti živi fetusi i kako bi se osiguralo da se nabroje sve resorpcije. Bilježi se fetalna smrtnost. Bilježi se i broj uspješno oplođenih ženki i ukupan broj implantacija, predimplantacijskih gubitaka i postimplantacijska smrtnost (uključujući rane i kasne resorpcije). Osim toga, vidljivi fetusi mogu se čuvati u Bouinovu fiksativu najmanje dva tjedna, nakon čega slijedi pregled kojim se utvrđuju velike vanjske deformacije (28.) kako bi se dobile dodatne informacije o reproduktivnim i razvojnim učincima ispitnog agensa.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

32. Podatke treba prikazati u obliku tablice iz koje se može vidjeti broj mužjaka koji su se parili, broj gravidnih ženki i broj negravidnih ženki. Rezultate svakog parenja, uključujući identifikacijsku oznaku svakog mužjaka i ženke, treba bilježiti pojedinačno. Za svaku ženku trebalo bi navesti interval parenja, visinu doze za tretirane mužjake i broj živih i mrtvih implantata.
33. Postimplantacijski gubitak računa se utvrđivanjem omjera mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj iz tretirane skupine u usporedbi s omjerom mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj iz kontrolne skupine s nosačem/otapalom.
34. Predimplantacijski gubitak računa se kao razlika između broja žutih tijela i broja implantata ili kao smanjenje prosječnog broja implantata po ženki u usporedbi s parenjima u kontrolnoj skupini. Ako su procijenjeni gubici prije implantacije, treba ih zabilježiti.
35. Čimbenik dominantne letalnosti procjenjuje se kao: $(\text{broj postimplantacijskih smrti} / \text{ukupan broj implantacija po ženki}) \times 100$.
36. Treba izvjestiti o podacima o toksičnosti i kliničkim znakovima (u skladu sa stavkom 29.).

Kriteriji prihvatljivosti

37. Prihvatljivost ispitivanja utvrđuje se na temelju sljedećih kriterija.
- Istodobna negativna kontrola u skladu je s objavljenim normama za podatke o prijašnjim negativnim kontrolama i podacima laboratorija o prijašnjim kontrolama, ako su dostupni (vidjeti stavke 10. i 18.).
 - Istodobne pozitivne kontrole induciraju odgovore koji su u skladu s objavljenim normama za podatke o prijašnjim pozitivnim kontrolama ili bazom podataka laboratorija o prijašnjim pozitivnim kontrolama, ako je dostupno, i dovode do statistički značajnog povećanja u usporedbi s negativnom kontrolom (vidjeti stavke 17. i 18.).
 - Analiziran je odgovarajući ukupan broj implantata i doza (stavak 20.).
 - Kriteriji za odabir najviše doze u skladu su s kriterijima opisanim u stavcima 24. i 27.

Ocjenjivanje i tumačenje rezultata

38. Treba analizirati barem tri skupine tretirane dozom da bi se prikupilo dovoljno podataka za analizu doze i odgovora.
39. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom:
- ako najmanje jedna od ispitnih doza pokazuje statistički značajno povećanje u usporedbi s istodobnom negativnom kontrolom,
 - ako je povećanje povezano s dozom u najmanje jednom pokusnom uvjetu (npr. tjedni interval parenja) kad se ocjenjuje odgovarajućim testom, i
 - ako je bilo koji od rezultata izvan prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili distribucije podataka laboratorija o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

Tad se smatra da ispitivana kemikalija može inducirati mutacije dominantnih letalnih gena u zametnim stanicama ispitnih životinja. Preporuke za najprikladnije statističke metode opisane su u stavku 44.; drugi preporučeni statistički pristupi mogu se pronaći i u literaturi (20., 21., 22., 24. i 29.). Upotrijebljena statistička ispitivanja trebala bi kao pokusnu jedinicu uzimati životinju.

40. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno negativnom:

- ako ni pri jednoj ispitnoj dozi nije zapaženo statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,
- ako ni u jednom pokusnom uvjetu nema povećanja povezanog s dozom, i
- ako su svi rezultati unutar prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

Tad se smatra da ispitivana kemikalija ne može inducirati mutacije dominantnih letalnih gena u zametnim stanicama ispitnih životinja.

41. Jasan pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeriti.

42. Ako odgovor nije jasno negativan ili pozitivan i kako bi se pomoglo utvrditi biološku relevantnost rezultata (npr. slabo ili granično povećanje), podatke bi trebalo ocjenjivati na temelju stručne prosudbe i/ili daljnjih istraživanja uz upotrebu postojećih eksperimentalnih podataka, kao što su razmatranja o tome je li pozitivan rezultat izvan prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili podataka laboratorija o prijašnjim negativnim kontrolama (30.).

43. U rijetkim slučajevima, čak i nakon dodatnih istraživanja, skup podataka neće omogućiti donošenje zaključka o tome je li rezultat pozitivan ili negativan te će se stoga zaključiti da je dvosmislen.

44. Upotrijebljena statistička ispitivanja trebala bi kao pokusnu jedinicu uzimati mužjaka. Iako je moguće da podaci o broju (npr. broj implantata po ženki) mogu odgovarati Poissonovoj distribuciji i/ili da udjeli (npr. udio mrtvih implantata) mogu biti binomno distribuirani, ti su podaci često previše raspršeni (31.). U skladu s tim, u statističkoj analizi prvo bi se trebao primijeniti test za veću ili manju raspršenost upotrebom testa varijance kao što je Cochranov test binomne varijance (32.) ili Taroneov $C(\alpha)$ test za binomnu veću raspršenost (31. i 33.). Ako se ne otkrije odstupanje od binomne raspršenosti, trendovi udjela u svim visinama doza mogu se ispitati upotrebom Cochran-Armitageova testa trenda (34.), a usporedba u parovima s kontrolnom skupinom može se ispitati upotrebom Fisherova egzaktnog testa (35.). Isto tako, ako se ne otkrije odstupanje od Poissonove raspršenosti, trendovi u brojevima mogu se ispitati upotrebom Poissonove regresije (36.), a usporedba u parovima s kontrolnom skupinom može se ispitati u kontekstu Poissonova modela upotrebom kontrasta u parovima (36.). Ako se otkrije znatno veća ili manja raspršenost, preporučuju se neparametarske metode (23. i 31.). One obuhvaćaju testove koji se temelje na rangovima, kao što su Jonckheere-Terpstraov test trenda (37.) i Mann-Whitneyjevi testovi (38.) za usporedbu u parovima s kontrolnom skupinom s nosačem/otapalom te testovi permutacija, ponovnog uzorkovanja i samonadopunjavanja (*bootstrap*) za trendove i usporedbe u parovima s kontrolnom skupinom (31. i 39.).

45. Pozitivni test dominantnih letalnih gena pruža dokaze o genotoksičnosti ispitivane kemikalije u zametnim stanicama tretiranog mužjaka ispitne vrste.

46. Pri procjeni biološke važnosti odgovora kao orijentacija mogu poslužiti razmatranje o tome jesu li uočene vrijednosti unutar ili izvan raspona prijašnjih kontrola (40.).

Izvjješće o ispitivanju

47. Izvjješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije.

*Sažetak**Ispitivana kemikalija:*

- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako su poznate,
- izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u mediju za uzgoj kulture u koji je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Priprema ispitivane kemikalije:

- obrazloženje za odabir nosača,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču, ako su poznate,
- priprema formulacija koje se unose s hranom, vodom za piće ili udisanjem,
- analitička određivanja formulacija (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije), ako se provode.

Ispitne životinje:

- vrsta/soj te obrazloženje tog odabira,
- broj, dob i spol životinja,

- podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,
- metoda jedinstvenog identificiranja životinja,
- za kratkotrajna istraživanja: pojedinačna tjelesna masa mužjaka na početku i na kraju ispitivanja; za istraživanja dulja od tjedan dana: pojedinačna tjelesna masa tijekom istraživanja i unos hrane. Trebalo bi uključiti raspon tjelesne mase, srednju vrijednost i standardno odstupanje za svaku skupinu.

Ispitni uvjeti:

- podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama (nosač/otapalo),
- podaci iz istraživanja za određivanje raspona,
- obrazloženje odabira visine doze,
- pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije,
- pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,
- obrazloženje odabira načina primjene,
- metode mjerenja toksičnosti životinje, uključujući, ako je dostupno, histopatološke ili hematološke analize i učestalost kojom su obavljeni promatranje i vaganje životinje,
- metode kojima se provjerava je li ispitivana kemikalija dospjela u ciljno tkivo ili krvotok, ako se dobiju negativni rezultati,
- stvarna doza (mg/kg tjelesne mase/dan) izračunata na temelju koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) i unosa hrane/vode, ako je primjenjivo,
- pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,
- pojedinosti o obogaćivanju okoliša u kavezu,
- detaljan opis režima tretiranja i uzorkovanja te obrazloženje tih odabira,
- metoda analgezije,
- metoda eutanazije,
- postupak izdvajanja i očuvanja tkiva,
- izvor i serijski brojevi sve opreme i reagensa (ako je primjenjivo),

- metode prebrojavanja dominantnih letalnih gena,
- režim parenja,
- metode korištene da bi se utvrdilo da je došlo do parenja,
- vrijeme eutanazije,
- kriteriji za ocjenjivanje dominantno letalnih učinaka, uključujući žuta tijela, implantacije, resorpcije i predimplantacijske gubitke, žive implantate i mrtve implantate.

Rezultati:

- stanje životinje prije i tijekom razdoblja ispitivanja, uključujući znakove toksičnosti,
- tjelesna masa mužjaka tijekom razdoblja tretiranja i parenja,
- broj parenih ženki,
- odnos doze i odgovora, ako je to moguće,
- podaci o istodobnim i prijašnjim negativnim kontrolama s rasponima, srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima,
- podaci o istodobnim pozitivnim kontrolama,
- tablični podaci za svaku ženku (majku), uključujući: broj žutih tijela po ženki; broj implantacija po ženki; broj resorpcija i predimplantacijskih gubitaka po ženki; broj živih implantata po ženki; broj mrtvih implantata po ženki; težine fetusa,
- prethodno navedeni podaci sažeti za svako razdoblje parenja i dozu, s učestalostima pojave mutacija dominantnih letalnih gena,
- primijenjene statističke analize i metode.

Rasprava o rezultatima.

Zaključak.

LITERATURA

1. OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Pariz.
2. Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.*(Eds.) str. 235.–334., Elsevier, Amsterdam.

3. Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Froberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group „Dominant” lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, *Arch. Toxicol.*, 39, 173.–185.
4. Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. *Mutation Res.*, 352:159.–167.
5. Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. *Mutation Res.*, 48:267.–270.
6. Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. *Mutation Res.*, 397:77.–74.
7. Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol. Lett.* 20:325.–329.
8. Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 3:80.–85.
9. Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, *Mutation Res.*, 33, 239.–249.
10. Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. *Biol. Reprod.*, 70:616.–624.
11. Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. *Birth Defects Res., C* 75:112.–129.
12. Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. *Mutation Res.*, 352:169.–172.
13. Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, *Mutation Res.*, 53: 21.–27.
14. Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. *Mutation Res.*, 345:167.–180.
15. Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, *Mutation Res.*, 40:371.–378.
16. James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, *Mutation Res.*, 99:303.–314.
17. Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. *Mutation Res.*, 173:35.–40.

18. Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, *Mutation Res.*, 296: 143.–156.
19. Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In *Supplementary Mutagenicity Tests*. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, str. 129.–156.
20. Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, *Mutation Res.*, 417:19.–30.
21. Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutation Res.*, 312:313.–318.
22. Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. *Methods, Toxicol.*, 3A:124.–141.
23. Haseman J.K. and Soares E.R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. *Mutation. Res.*, 41: 277.–288.
24. Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 1:353.–360.
25. Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. *Mutation. Res.*, 85:417.–429.
26. Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagen.*, 7:313.–319.
27. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
28. Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291.–306.
29. Kirkland D.J., (Ed.)(1989). *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Cambridge University Press.
30. Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). „Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data”, *Mutation. Res.*, 723:87.–90.
31. Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. *Mutation. Res.*, 272:35.–58.
32. Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. *Biometrics*, 10:103. 417.–451.

33. Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585.–590.
34. Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. U *Encyclopedia of Statistical Sciences*, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), str. 334.–336. John Wiley and Sons, New York.
35. Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).
36. Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, poglavlja 14. i 17. McGraw-Hill, Boston.
37. Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika*, 41:133.–145.
38. Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York.
39. Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.
40. Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Kemikalija: tvar ili smjesa

Žuto tijelo (tijela): struktura koja luči hormone i koja nastaje na jajniku na mjestu folikula koji je ispustio jajašce. Broj žutih tijela u jajnicima odgovara broju jajašaca koja su ovulirala.

Mutacija dominantnih letalnih gena: mutacija do koje dolazi u zametnoj stanici ili koja se fiksira nakon oplodnje, a uzrokuje embrionalnu ili fetalnu smrt.

Stopa plodnosti: broj parenih gravidnih ženki u odnosu na broj parenih ženki.

Interval parenja: vrijeme od kraja izlaganja do parenja tretiranih mužjaka. Kontrolom tog intervala mogu se procijeniti kemijski učinci na različite vrste zametnih stanica. Kod miševa koji se pare tijekom 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. i 8. tjedna nakon kraja izlaganja mjere se učinci na spermu, kondenzirane spermatide, okrugle spermatide, spermatocite u fazi pahitena, rane spermatocite, diferencirane spermatogonije, diferencirajuće spermatogonije i matične spermatogonije.

Predimplantacijski gubitak: razlika između broja implantata i broja žutih tijela. Može se procijeniti i usporedbom ukupnog broja implantata po ženki u tretiranoj i kontrolnoj skupini.

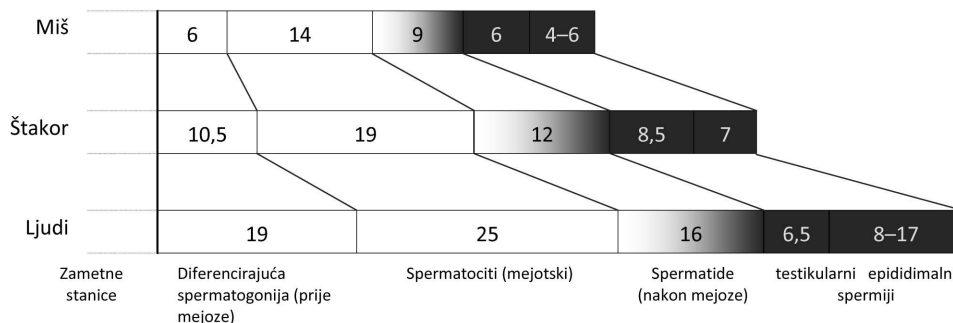
Predimplantacijski gubitak: omjer mrtvih implantata u tretiranoj skupini u usporedbi s omjerom mrtvih implantata u odnosu na njihov ukupan broj u kontrolnoj skupini.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

UVCB: kemijske tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Dodatak 2.

TIJEK SPERMATOGENEZE U SISAVACA



Slika 1.: Usporedba trajanja (u danima) razvoja muških zametnih stanica u miševa, štakora i ljudi. Do popravka DNK ne dolazi tijekom razdoblja koja su osjenčana.

Gore je prikazan shematski prikaz spermatogeneze u miševa, štakora i ljudi (preuzeto iz Adler, 1996.). Nediferencirane spermatogonije uključuju: spermatogonije tipa A_s , A_{pr} i A_{al} (Hess i de Franca, 2008.). A_s se smatra pravom matičnom stanicom; stoga od posljednje injekcije ispitivane kemikalije do parenja mora proći najmanje 49 dana (kod miševa) kako bi se procijenili učinci na zametne stanice.

Referentni dokumenti

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. *Mutat Res*, 352:169.–172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. U: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1.–15."

(4) u dijelu B poglavlje B.23. zamjenjuje se sljedećim:

„B.23. ISPITIVANJE KROMOSOMSKIH ABERACIJA U SPERMATOGONIJAMA SISAVACA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 483 (2016.). Ispitne metode periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak, promjene regulatornih potreba i razmatranja o dobrobiti životinja. U ovoj izmijenjenoj verziji ispitne metode uzimaju se u obzir godine iskustva s tim testom i mogućnost integriranja ili kombiniranja tog ispitivanja s drugim studijama toksičnosti ili genotoksičnosti. Kombiniranjem studija toksičnosti može se smanjiti broj životinja koje se upotrebljavaju u ispitivanjima toksičnosti. Ova je ispitna metoda dio niza ispitnih metoda u području genetske toksikologije. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti (1.).
2. Svrha je *in vivo* testa kromosomskih aberacija u spermatogonijama sisavaca utvrditi kemikalije koje uzrokuju strukturne kromosomske aberacije u spermatogonijskim stanicama sisavaca (2., 3. i 4.). Osim toga, ovo je ispitivanje relevantno za ocjenu genotoksičnosti jer, iako se mogu razlikovati među vrstama, faktori *in vivo* metabolizma, farmakokinetika i procesi popravka DNK aktivni su i pridonose odgovorima. Ova ispitna metoda nije namijenjena mjerenju numeričkih abnormalnosti; test se ne upotrebljava rutinski u tu svrhu.
3. Ovim se ispitivanjem mjere strukturne kromosomske aberacije (i kromosomskog i kromatidnog tipa) u spermatogonijskim zametnim stanicama u fazi diobe te se stoga očekuje da se tim ispitivanjem može predvidjeti indukcija nasljednih mutacija u tim zametnim stanicama.
4. Definicije ključnih pojmova utvrđene su u Dodatku.

POČETNA RAZMATRANJA

5. U ovom ispitivanju obično se upotrebljavaju glodavci, ali i druge vrste mogu biti prikladne u određenim slučajevima, ako je to znanstveno opravdano. Standardni citogenetski preparati sjemenika glodavaca daju mitotske (spermatogonije) i mejotske (spermatocit) metafaze. Mitotske i mejotske metafaze utvrđuju se na temelju morfologije kromosoma (4.). Ovim se *in vivo* citogenetskim testom otkrivaju strukturne kromosomske aberacije pri spermatogonijskoj mitozu. Druge ciljne stanice nisu predmet ove ispitne metode.
6. Kako bi se moglo otkriti aberacije kromatidnog tipa u spermatogonijskim stanicama, treba ispitati prvu mitotsku diobu stanica nakon tretiranja, prije nego što se te aberacije pretvore u aberacije kromosomskog tipa u kasnijim staničnim diobama. Dodatne informacije o tretiranim spermatocitima mogu se dobiti analizom strukturnih kromosomskih aberacija kod kromosoma tijekom mejoze u dijakinezi-metafazi I i metafazi II.
7. U sjemeniku se nalaze brojne generacije spermatogonija (5.) i te različite vrste zametnih stanica mogu biti različito osjetljive na tretiranje kemikalijama. Prema tome, uočene aberacije predstavljaju skupnu reakciju tretiranih populacija spermatogonijskih stanica. Većinu mitotskih stanica u preparatima sjemenika čine spermatogonije tipa B, koje imaju stanični ciklus od približno 26 sati (3.).
8. Ako postoje dokazi da ispitivana kemikalija ili njezini metaboliti neće dospjeti do sjemenika, ovaj oblik ispitivanja nije prikladan.

NAČELO ISPITNE METODE

9. Obično se životinje izlažu ispitivanoj kemikaliji prikladnim načinom izlaganja i eutanaziraju u odgovarajućim trenucima nakon tretiranja. Prije eutanazije životinje se tretiraju agensom za zaustavljanje metafaze (npr. kolhicinom ili Colcemidom®). Nakon toga naprave se i oboje kromosomski preparati zametnih stanica te se analizom utvrđuje je li došlo do kromosomskih aberacija metafaznih stanica.

PROVJERA OSPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

10. Osposobljenost za provedbu ovog testa trebalo bi utvrditi dokazivanjem sposobnosti reproduciranja očekivanih rezultata za učestalost pojave kromosomske aberacije kod spermatogonija s tvarima za pozitivnu kontrolu (uključujući slabe odgovore), kao što su one navedene u tablici 1., te postizanja učestalosti u negativnim kontrolama koje su u skladu s prihvatljivim rasponom podataka o kontrolama u objavljenoj literaturi (npr. 2., 3., 6., 7., 8., 9. i 10.) ili distribucijom prijašnjih kontrola laboratorija, ako su dostupni.

OPIS METODE

Pripreme*Odabir životinjske vrste*

11. Trebalo bi upotrebljavati zdrave, mlade odrasle životinje sojeva koji se obično upotrebljavaju u laboratorijskim istraživanjima. Obično se upotrebljavaju mužjaci miševa; međutim, mogu se upotrebljavati mužjaci drugih prikladnih vrsta sisavaca ako za to postoji znanstveno opravdanje i ako se time omogućuje da se ispitivanje provodi zajedno s drugom ispitnom metodom. U izvješću bi trebalo navesti znanstveno opravdanje za uporabu drugih vrsta osim glodavaca.

Uvjeti smještaja i hranjenja životinja

12. U slučaju glodavaca, temperatura prostorije u kojoj se drže životinje trebala bi biti 22 °C (± 3 °C). Iako bi u idealnim okolnostima relativna vlažnost trebala biti 50–60 %, ona bi trebala biti najmanje 40 %, a poželjno je da ne prelazi 70 %, osim tijekom čišćenja prostorije. Rasvjeta bi trebala biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može upotrebljavati konvencionalna laboratorijska hrana uz neograničenu količinu vode za piće. Kad se ispitivana kemikalija primjenjuje ovim načinom izlaganja, na izbor prehrane može utjecati potreba da se osigura odgovarajuća primjesa ispitivane kemikalije. Glodavci bi trebali biti smješteni u malim skupinama (ne više od pet po kavezu) ako se ne očekuje agresivno ponašanje, po mogućnosti u kavezima s čvrstim podom i uz prikladno obogaćivanje okoliša. Ako je to znanstveno opravdano, životinje se mogu držati u zasebnim nastambama.

Priprema životinja

13. Obično se upotrebljavaju zdravi mladi odrasli mužjaci (stari 8–12 tjedana na početku tretiranja) te se nasumce raspoređuju u kontrolne skupine i skupine za tretiranje. Pojedinačne životinje označuju se na jedinstven način upotrebom humane, najmanje invazivne metode (npr. prstenovanjem, stavljanjem oznaka, mikročipiranjem ili biometrijskom identifikacijom, ali ne rezanjem uha ili prsta) i prilagođavaju laboratorijskim uvjetima najmanje pet dana. Kaveze bi trebalo rasporediti tako da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Trebalo bi izbjegavati unakrsnu kontaminaciju pozitivnom kontrolom i ispitivanom kemikalijom. Na početku istraživanja variranje tjelesne mase pojedinačnih životinja treba biti što manje i ne smije prelaziti ± 20 %.

Priprema doza

14. Prije nego što se doza daje životinjama, krute ispitivane tvari po potrebi treba otopiti ili suspendirati u odgovarajućim otapalima ili nosačima ili dodati hrani ili vodi za piće. Tekuće ispitivane kemikalije mogu se dozirati izravno ili razrijediti prije doziranja. Za potrebe inhaliranja, ispitivane kemikalije mogu se primijeniti u obliku plina, pare ili krutog/tekućeg aerosola, ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima. Ako prema podacima o stabilnosti skladištenje nije prihvatljivo i ako nisu utvrđeni prikladni uvjeti skladištenja, preparate ispitivane kemikalije trebalo bi upotrebljavati svježe.

Ispitni uvjeti – otapalo/nosač

15. Pri visinama doza koje se primjenjuju otapalo/nosač ne smije imati toksične učinke i ne smije postojati sumnja da bi mogao kemijski reagirati s ispitivanim kemikalijama. Ako se upotrebljavaju otapala/nosači koji nisu dobro poznati, njihovo uključivanje u ispitivanje trebalo bi potkrijepiti referentnim podacima kojima se dokazuje njihova usklađenost. Kad je god moguće, preporučuje se najprije razmotriti mogućnost primjene vodenog otapala/nosača. Primjeri uobičajeno korištenih usklađenih otapala/nosača uključuju vodu, fiziološku otopinu, otopinu metil-celuloze, otopinu natrijeve soli karboksimetilne celuloze, maslinovo ulje i kukuruzno ulje. Ako ne postoje prijašnji ili objavljeni podaci o kontrolama kojima se dokazuje da odabranim atipičnim otapalom/nosačem nisu inducirane strukturne kromosomske aberacije ili drugi štetni učinci, trebalo bi provesti početno istraživanje kako bi se utvrdila prihvatljivost kontrole s otapalom/nosačem.

Pozitivne kontrole

16. Uvijek bi se trebale upotrebljavati životinje istodobnih pozitivnih kontrola, osim ako je laboratorij dokazao osposobljenost za provedbu ispitivanja te je u nedavnoj prošlosti rutinski upotrebljavao ispitivanje (npr. u posljednjih pet godina). Ako nije uključena istodobna pozitivna kontrolna skupina, u svaki pokus trebalo bi uključiti kontrole ocjenjivanja (fiksirana i nebojena predmetna stakalca). One se mogu dobiti uključivanjem u ocjenjivanje istraživanja prikladnih referentnih uzoraka koji su dobiveni i pohranjeni iz zasebnog pokusa s pozitivnom kontrolom koji se provodi periodično (npr. svakih šest do 18 mjeseci) u laboratoriju u kojem se provodi ispitivanje; na primjer, tijekom ispitivanja osposobljenosti laboratorija i redovito nakon toga, ako je potrebno.
17. Tvari za pozitivnu kontrolu trebale bi pouzdano izazvati zamjetno povećanje učestalosti stanica sa strukturnim kromosomskim aberacijama iznad spontanih razina. Doze pozitivnih kontrola trebalo bi odabrati tako da učinci budu jasni, ali da analitičar ne može odmah vidjeti identitet kodiranih uzoraka. Primjeri tvari za pozitivnu kontrolu navedeni su u tablici 1.

*Tablica 1.***Primjeri tvari za pozitivnu kontrolu**

Tvari [CAS br.] (referentni br.)
Ciklofosamid (monohidrat) [CAS br. 50-18-0 (CAS br. 6055-19-2)] (9.)
Cikloheksilamin [CAS br. 108-91-8] (7.)
Mitomycin C [CAS br. 50-07-7] (6.)
Monomerni akrilamid [CAS 79-06-1] (10.)
Trietilenmelamin [CAS 51-18-3] (8.)

Negativne kontrole

18. Životinje negativne kontrole, koje se tretiraju samo s otapalom ili nosačem, a inače se tretiraju jednako kao skupine za tretiranje, trebale bi biti uključene u svako vrijeme uzorkovanja. Ako ne postoje prijašnji ili objavljeni kontrolni podaci kojima se dokazuje da odabrano otapalo ili nosač ne inducira nikakve kromosomske aberacije ili druge štetne učinke, i netretirane kontrolne životinje trebale bi biti uključene u svako vrijeme uzorkovanja kako bi se utvrdila prihvatljivost kontrole s nosačem.

POSTUPAK**Broj životinja**

19. Na početku istraživanja trebalo bi utvrditi veličine skupina kako bi se po skupini osiguralo minimalno pet mužjaka. Taj se broj životinja smatra dovoljnim za dobivanje primjerene statističke snage (tj. općenito se može otkriti barem udvostručenje učestalosti pojave kromosomske aberacije kad je razina negativne kontrole 1,0 % ili veća s 80-postotnom vjerojatnošću pri razini značajnosti od 0,05) (3. i 11.). Kao smjernica za uobičajene maksimalne zahtjeve u pogledu životinja, za istraživanje s dva vremena uzorkovanja, s tri skupine koje primaju dozu i istodobnom negativnom kontrolnom skupinom plus pozitivnom kontrolnom skupinom (pri čemu se svaka skupina sastoji od pet životinja) bilo bi potrebno 45 životinja.

Režim tretiranja

20. Ispitivane kemikalije obično se primjenjuju jednom (tj. kao jednokratno tretiranje); mogu se primjenjivati i drugi režimi doziranja uz uvjet da su znanstveno opravdani.
21. Kod skupine na koju se primjenjuje najviša doza uzorci se uzimaju dvaput nakon tretiranja. Budući da vrijeme potrebno za apsorpciju i metabolizam ispitivane kemikalije ili kemikalija, kao i njezino djelovanje na kinetiku staničnog ciklusa, mogu utjecati na optimalno vrijeme za otkrivanje kromosomskih aberacija, jedno se uzorkovanje obavlja ranije, a jedno kasnije, približno 24 sata i 48 sati nakon tretiranja. Kod ostalih doza ranije uzorke treba uzeti 24 sata nakon tretiranja (manje od trajanja staničnog ciklusa spermatogonija tipa B ili jednako tom trajanju, čime se poboljšava vjerojatnost ocjene prve metafaze nakon tretiranja), osim ako je poznato da je neko drugo vrijeme uzorkovanja primjerenije i opravdano.
22. Uzorci se mogu uzeti i u neko drugo vrijeme. Na primjer, u slučaju kemikalija koje imaju učinke neovisne o S-fazi, uzorkovanja može biti primjereno obaviti ranije (tj. u razdoblju kraćem od 24 sata).
23. Može se upotrijebiti režim ponovljenih doza tretiranja, na primjer, zajedno s ispitivanjem na drugoj krajnjoj točki kod koje se upotrebljava razdoblje primjene od 28 dana (npr. ispitna metoda B.58.); međutim, bile bi potrebne dodatne skupine životinja kako bi se uzela u obzir različita vremena uzorkovanja. U skladu s tim, primjerenost tog režima treba znanstveno opravdati od slučaja do slučaja.
24. Prije eutanazije životinjama se intraperitonealno ubrizgava odgovarajuća doza kemikalije za zaustavljanje metafaze (npr. Colcemid® ili kolhicin). Zatim se nakon odgovarajućeg vremenskog intervala životinje podvrgavaju uzorkovanju. Za miševe i štakore taj interval iznosi približno 3–5 sati.

Visine doza

25. Ako se provodi preliminarno istraživanje za određivanje raspona doza jer još nisu dostupni prikladni podaci koji bi pomogli u odabiru doza, trebalo bi ga provesti u istom laboratoriju primjenom iste vrste, soja i režima tretiranja kao i u glavnom istraživanju, u skladu s preporukama za provođenje istraživanja za određivanje raspona doza (12.). Tim bi se istraživanjem trebala odrediti maksimalna podnošljiva doza (MTD), koja se definira kao doza koja inducira blage toksične učinke povezane s trajanjem istraživanja (na primjer, neuobičajeno ponašanje ili reakcije, manji gubitak tjelesne mase ili hematopoetska sustavna citotoksičnost), ali ne inducira smrt ili znakove boli, patnje ili stresa zbog kojih bi životinju trebalo eutanazirati (13.).
26. Najviša se doza može definirati i kao doza pri kojoj se javljaju određeni znakovi toksičnosti u spermatogonijskim stanicama (npr. smanjenje omjera spermatogonijskih mitoza u odnosu na prvu i drugu mejotsku metafazu). Navedeno smanjenje ne bi smjelo prelaziti 50 %.

27. Ispitivane kemikalije s posebnim biološkim djelovanjem u slabim netoksičnim dozama (kao što su hormoni i mitogeni) i kemikalije koje pokazuju zasićenost toksikokinetičkih svojstava mogu se izuzeti iz kriterija u pogledu određivanja doza i trebale bi se procjenjivati od slučaja do slučaja.
28. Kako bi se dobile informacije o odgovoru na dozu, potpuno istraživanje trebalo bi uključivati negativnu kontrolnu skupinu (stavak 18.) i minimalno tri visine doze pri čemu je svaka uglavnom dvostruko veća od prethodne, ali najviše četverostruko. Ako ispitivana kemikalija u istraživanju za određivanje raspona ili na temelju postojećih podataka ne izaziva toksičnost, najviša doza za jednu primjenu trebala bi biti 2 000 mg/kg tjelesne mase. Međutim, ako ispitivana kemikalija uzrokuje toksičnost, MTD bi trebao biti najviša primijenjena doza i poželjno je da se primijenjenim visinama doze obuhvati raspon od maksimalne doze do doze koja izaziva malu toksičnost ili ne izaziva toksičnost. Ako je toksičnost ciljnog tkiva (tj. sjemenika) zapažena pri svim ispitanim visinama doza, preporučuje se daljnje istraživanje pri netoksičnim dozama. Za istraživanja čiji je cilj potpunije opisati kvantitativne informacije o odgovoru na dozu mogu biti potrebne dodatne skupine koje primaju dozu. Za određene vrste ispitivanih kemikalija (npr. za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima) obuhvaćene posebnim zahtjevima ta se ograničenja mogu razlikovati. Ako ispitivana kemikalija uzrokuje toksičnost, trebala bi se odabrati granična doza i dvije manje doze (kako je prethodno opisano). Granična doza za razdoblje primjene od 14 dana ili više iznosi 1 000 mg/kg tjelesne mase dnevno, a za razdoblja primjene kraća od 14 dana granična doza iznosi 2 000 mg/kg tjelesne mase dnevno.

Primjena doza

29. Pri planiranju testa u obzir bi trebalo uzeti očekivani način izlaganja ljudi. Stoga se, ako je to opravdano, mogu odabrati načini izlaganja kao što su unos s hranom, unos s vodom za piće, lokalna primjena potkožno, intravenozna primjena, oralna primjena (oralna intubacija), udisanje ili implantacija. U svakom bi slučaju odabrani put trebao biti takav da se osigura odgovarajuća izloženost ciljnog tkiva. Intraperitonealna injekcija obično se ne preporučuje, osim ako je znanstveno opravdana, jer obično nije fiziološki odgovarajući put izlaganja ljudi. Ako se ispitivana kemikalija dodaje hrani ili vodi za piće, posebno u slučaju primjene jedne doze, trebalo bi voditi računa o tome da se osigura dostatno vrijeme od unosa hrane i vode do uzorkovanja kako bi se omogućilo otkrivanje učinaka (vidjeti stavak 33.). Maksimalni volumen tekućine koji se odjednom može primijeniti oralnom intubacijom ili injekcijom ovisi o veličini ispitne životinje. Taj volumen obično ne bi trebao biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim u slučaju vodenih otopina kod kojih je dopušteno upotrijebiti maksimalno 2 ml/100 g tjelesne mase. Primjene većih volumena od navedenog (ako je dopušteno zakonodavstvom o dobrobiti životinja) treba opravdati. Variranje ispitnih volumena treba svesti na minimum podešavanjem koncentracije kako bi se kod svih visina doza osigurao stalni volumen u odnosu na tjelesnu masu.

Opažanja

30. Najmanje jednom dnevno treba provoditi opća klinička opažanja o ispitnim životinjama i zabilježiti kliničke znakove, po mogućnosti svaki dan u isto vrijeme ili vremena, vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih učinaka nakon doziranja. Najmanje dvaput dnevno kod svih životinja treba provjeriti ima li slučajeva morbiditeta ili smrtnosti. Sve životinje trebalo bi izvagati na početku istraživanja, najmanje jednom tjedno tijekom istraživanja s ponovljenim dozama, i prilikom eutanazije. U istraživanjima koja traju najmanje tjedan dana trebalo bi najmanje jednom tjedno mjeriti unos hrane. Ako se ispitivana kemikalija daje s vodom za piće, trebalo bi mjeriti unos vode pri svakoj promjeni vode i najmanje jednom tjedno. Životinje koje pokazuju nesmrtonosne pokazatelje prekomjerne toksičnosti trebalo bi eutanazirati prije dovršetka razdoblja ispitivanja (13.).

Kromosomski pripravek

31. Odmah po eutanaziji životinje napravi se suspenzija zametnih stanica iz jednog ili oba sjemenika, koja se izlaže hipotoničkoj otopini i fiksira primjenom utvrđenih protokola (npr. 2., 14. i 15.). Zatim se stanice razmažu po mikroskopskom stakalcu i oboje (16. i 17.). Sva bi stakalca trebala kodirati tako da analitičar ne zna njihov identitet.

Analiza

32. Za svaku životinju treba pregledati najmanje 200 dobro raširenih metafaza (3. i 11.). Ako je učestalost u prijašnjim negativnim kontrolama < 1 %, trebalo bi pregledati više od 200 stanica po životinji kako bi se povećala statistička snaga (3.). Trebale bi se upotrebljavati metode bojenja koje omogućuju utvrđivanje centromera.

33. Aberacije kromosomskog i kromatidnog tipa trebalo bi zabilježiti odvojeno i klasificirati prema podtipovima (lomovi, zamjene). Prekide bi trebalo zabilježiti, ali ne i uzimati u obzir, prilikom utvrđivanja inducira li kemikalija znatna povećanja učestalosti stanica s kromosomskim aberacijama. U postupcima koji se primjenjuju u laboratoriju trebalo bi osigurati da analizu kromosomskih aberacija provode dobro osposobljeni analitičari. Uzimajući u obzir da postupci pripreme predmetnih stakalaca često za posljedicu imaju lom jednog dijela metafaza uz posljedični gubitak kromosoma, stanice koje se pregledavaju trebale bi stoga sadržavati broj centromera koji nije manji od $2n \pm 2$, pri čemu je n haploidan broj kromosoma za tu vrstu.
34. Iako je svrha ovog ispitivanja otkrivanje strukturnih kromosomskih aberacija, važno je zabilježiti učestalost poliploidnih stanica i stanica s endoredupliciranim kromosomima ako se opaze te pojave (vidjeti stavak 44.).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Obrada rezultata

35. Podatke o pojedinačnim životinjama trebalo bi prikazati u tabličnom obliku. Za svaku životinju treba odrediti broj stanica sa strukturnim kromosomskim aberacijama i broj kromosomskih aberacija po stanici. Aberacije kromatidnog i kromosomskog tipa, klasificirane prema podtipovima (lomovi, zamjene), trebalo bi navesti odvojeno, s njihovim brojem i učestalošću za pokusne i kontrolne skupine. Prekidi se bilježe zasebno. Iako se bilježi učestalost kromosomskih prekida, ona se općenito ne uključuje u analizu ukupne učestalosti strukturnih kromosomskih aberacija. Postotak poliploidnih stanica i stanica s endoredupliciranim kromosomima bilježi se ako su zapažene takve stanice.
36. Treba izvijestiti o podacima o toksičnosti i kliničkim znakovima (u skladu sa stavkom 30.).

Kriteriji prihvatljivosti

37. Prihvatljivost ispitivanja utvrđuje se na temelju sljedećih kriterija.
- Istodobna negativna kontrola u skladu je s objavljenim normama za podatke o negativnim kontrolama iz prijašnjih istraživanja, kod kojih se obično očekuje $> 0\%$ i $\leq 1,5\%$ stanica s kromosomskim aberacijama, i podacima o prijašnjim kontrolama laboratorija, ako su dostupni (vidjeti stavke 10. i 18.).
 - Istodobne pozitivne kontrole induciraju odgovore koji su u skladu s objavljenim normama za podatke o prijašnjim pozitivnim kontrolama ili bazom podataka laboratorija o prijašnjim podacima o pozitivnoj kontroli, ako je dostupna, i dovode do statistički značajnog povećanja u usporedbi s negativnom kontrolom (vidjeti stavke 17. i 18.).
 - Analiziran je odgovarajući broj stanica i doza (vidjeti stavke 28. i 32.).
 - Kriteriji za odabir najviše doze u skladu su s kriterijima opisanima u stavcima 25. i 26.
38. Ako se promatraju i mitozu i mejozu, omjer spermatogonijskih mitozu u odnosu na prvu i drugu mejotsku metafazu treba utvrditi kao mjerilo citotoksičnosti za sve tretirane životinje i životinje negativne kontrole, na ukupnom uzorku od 100 stanica u fazi diobe po životinji. Ako se promatra samo mitozu, potrebno je utvrditi mitotski indeks u barem 1 000 stanica za svaku životinju.

Ocjnjivanje i tumačenje rezultata

39. Treba analizirati barem tri skupine tretirane dozom da bi se prikupili odgovarajući podaci za analizu doze i odgovora.

40. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom:

- ako najmanje jedna od ispitnih doza pokazuje statistički značajno povećanje u usporedbi s istodobnom negativnom kontrolom,
- ako je u najmanje jednom vremenu uzorkovanja to povećanje povezano s dozom, te
- ako je bilo koji od rezultata izvan prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

Tad se smatra da ispitivana kemikalija može inducirati kromosomske aberacije spermatogonijskih stanica ispitnih životinja. Preporuke o najprikladnijim statističkim metodama dostupne su i u literaturi (11. i 18.). Upotrijebljena statistička ispitivanja trebala bi kao pokusnu jedinicu uzimati životinju.

41. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno negativnom:

- ako ni pri jednoj ispitnoj dozi nije zapaženo statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,
- ako ni u jednom pokusnom uvjetu nema povećanja povezanog s dozom, te
- ako su svi rezultati unutar prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji), ako su dostupni.

Tad se smatra da ispitivana kemikalija ne može inducirati kromosomske aberacije spermatogonijskih stanica ispitnih životinja. Preporuke o najprikladnijim statističkim metodama dostupne su i u literaturi (11. i 18.). Negativan rezultat ne isključuje mogućnost da kemikalija može inducirati kromosomske aberacije u kasnijim fazama razvoja koje se ne istražuju, ili genske mutacije.

42. Jasan pozitivan ili jasan negativan odgovor nije potrebno provjeriti.

43. Ako odgovor nije jasan negativan ili pozitivan i kako bi se pomoglo utvrditi biološku relevantnost rezultata (npr. slabo ili granično povećanje), podatke bi trebalo ocjenjivati na temelju stručne prosudbe i/ili daljnjih istraživanja uz upotrebu postojećih eksperimentalnih podataka, kao što su razmatranja o tome je li pozitivan rezultat izvan prihvatljivog raspona podataka o negativnim kontrolama ili podataka laboratorija o prijašnjim negativnim kontrolama (19.).

44. U rijetkim slučajevima, čak i nakon dodatnih istraživanja, skup podataka neće omogućiti donošenje zaključka o tome je li rezultat pozitivan ili negativan te će se stoga zaključiti da je dvosmislen.

45. Povećanje broja poliploidnih stanica može značiti da ispitivana kemikalija može inhibirati mitotske procese i inducirati numeričke kromosomske aberacije (20.). Povećanje broja stanica s endoredupliciranim kromosomima može značiti da ispitivana kemikalija može inhibirati progresiju staničnog ciklusa (21. i 22.), a to je drugačiji mehanizam induciranja numeričkih kromosomskih promjena od inhibiranja mitotskih procesa (vidjeti stavak 2.). Stoga bi učestalost poliploidnih stanica i stanica s endoredupliciranim kromosomima trebalo zabilježiti odvojeno.

Izvješće o ispitivanju

46. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Sažetak.

Ispitivana kemikalija:

- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako su poznate,
- izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u mediju za uzgoj kulture u koji je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Priprema ispitivane kemikalije:

- obrazloženje za odabir nosača,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču,
- priprema formulacija koje se unose s hranom, vodom za piće ili udisanjem,
- analitička određivanja formulacija (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije ako se provode).

Ispitne životinje:

- vrsta/soj te obrazloženje njihove uporabe,
- broj i dob životinja,
- podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,

- metoda jedinstvenog identificiranja životinja,
- za kratkotrajna istraživanja: pojedinačna tjelesna masa životinja na početku i na kraju ispitivanja; za istraživanja dulja od tjedan dana: pojedinačna tjelesna masa tijekom istraživanja i unos hrane. Trebalo bi uključiti raspon tjelesne mase, srednju vrijednost i standardno odstupanje za svaku skupinu.

Ispitni uvjeti:

- podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama (nosač/otapalo),
- podaci iz istraživanja o utvrđivanju raspona, ako je provedeno,
- obrazloženje odabira visine doze,
- obrazloženje odabira načina primjene,
- pojedinosti o pripremi ispitivane kemikalije,
- pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,
- obrazloženje za vremena usmrćivanja životinja,
- metode mjerenja toksičnosti životinje, uključujući, ako je dostupno, histopatološke ili hematološke analize i učestalost kojom su obavljeni promatranje i vaganje životinje,
- metode kojima se provjerava je li ispitivana kemikalija dospjela u ciljno tkivo ili krvotok, ako se dobiju negativni rezultati,
- stvarna doza (mg/kg tjelesne mase/dan) izračunata na temelju koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) i unosa hrane/vode, ako je primjenjivo,
- pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,
- detaljan opis režima tretiranja i uzorkovanja te obrazloženje tih odabira,
- metoda eutanazije,
- metoda analgezije (ako se primjenjuje),
- postupci izdvajanja tkiva,
- naziv (identifikacijska oznaka) kemikalije za zaustavljanje metafaze, njezina koncentracija i trajanje primjene,
- metode pripreme predmetnih stakalaca,

- kriteriji za ocjenu aberacija,
- broj analiziranih stanica po životinji,
- kriteriji prema kojima se istraživanje smatra pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

Rezultati:

- stanje životinje prije i tijekom razdoblja ispitivanja, uključujući znakove toksičnosti,
- mase tijela i organa prije usmrćivanja (ako se primjenjuje više tretiranja, mase tijela izmjerene tijekom režima tretiranja),
- znakovi toksičnosti,
- mitotski indeks,
- omjer spermatogonijskih mitotskih stanica u odnosu na prvu i drugu mejotsku metafazu, ili drugi dokaz izloženosti ciljnom tkivu,
- vrsta i broj aberacija, navedeni za svaku životinju zasebno,
- ukupan broj aberacija po skupini sa srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima,
- broj stanica s aberacijama po skupini sa srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima,
- odnos doze i odgovora, ako je to moguće,
- primijenjene statističke analize i metode,
- podaci o istodobnim negativnim kontrolama,
- podaci o prijašnjim negativnim kontrolama, zajedno s rasponima, srednjim vrijednostima, standardnim devijacijama i intervalom pouzdanosti od 95 % (ako je dostupan) ili objavljeni podaci o prijašnjim negativnim kontrolama koji se upotrebljavaju za prihvatljivost rezultata ispitivanja,
- podaci o istodobnim pozitivnim kontrolama,
- promjene ploidije ako su zapažene, uključujući učestalost poliploidnih i/ili endoredupliciranih stanica.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

1. OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Pariz.
2. Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. U: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, str. 275.–306.
3. Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313.–318.
4. Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167.–189.
5. Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. U: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, str. 1.–15.
6. Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368.–379. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. U: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, str. 477.–484.
7. Cattanaach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472.–474.
8. Cattanaach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371.–375.
9. Rathenbourg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135.–140.
10. Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313.–324.
11. Adler I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19.–30.
12. Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313.–319.

13. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
14. Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutation Res.*, 52, 207.–209.
15. Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. *Environ. Mutagen.*, 1, 291.–294.
16. Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, 289.–294.
17. Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, U: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 115.–141.
18. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays U: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 184.–232.
19. Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutation Res.*, 723, 87.–90.
20. Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, *Mutation Res.*, 287, 29.–46.
21. Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. *Cancer Res.*, 43, 1362.–1364.
22. Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. *Mutation Res.*, 119, 403.–413.

Dodatak

DEFINICIJE

Aneuploidija: svako odstupanje od uobičajenog diploidnog (ili haploidnog) broja kromosoma za jedan kromosom ili više njih, ali ne za cijelu skupinu ili skupine kromosoma (poliploidija).

Centromera: područje ili područja kromosoma s kojima su tijekom stanične diobe povezane niti diobenog vretena, čime se omogućuje uredno kretanje kromosoma kćeri prema polovima stanica kćeri.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Raznolikost kromosoma: raznolikost oblika kromosoma (npr. metacentrični, akrocentrični itd.) i njihovih veličina.

Aberacija kromatidnog tipa: strukturno oštećenje kromosoma izraženo kao lom pojedinačnih kromatida ili lom i ponovno spajanje kromatida.

Aberacija kromosomskog tipa: strukturno oštećenje kromosoma izraženo kao lom ili lom i ponovno spajanje obiju kromatida na istom mjestu.

Klastogen: svaka kemikalija koja uzrokuje strukturne kromosomske aberacije u populacijama stanica ili organizama.

Prekid: akromatska lezija manja od širine jedne kromatide i s minimalnim odklonom kromatida.

Genotoksičnost: opći izraz kojim su obuhvaćene sve vrste oštećenja DNK ili kromosoma uključujući lomove, delecije, adukte, modifikacije i povezivanje nukleotida, premještanja, mutacije, aberacije kromosoma i aneuploidiju. Ne dovode sve vrste genotoksičnih učinaka do mutacija ili trajnog oštećenja kromosoma.

Mitotski indeks: omjer stanica u metafazi podijeljen s ukupnim brojem stanica zapaženih u populaciji stanica; pokazatelj stupnja proliferacije te populacije.

Mitoza: dioba stanične jezgre koja je obično podijeljena na profazu, prometafazu, metafazu, anafazu i telofazu.

Mutagen: uzrokuje nasljednu promjenu slijeda (sljedova) parova baza DNK u genima ili strukture kromosoma (kromosomske aberacije).

Numerička abnormalnost: promjena u broju kromosoma u odnosu na normalni broj koji je karakterističan za korištene životinje.

Poliploidija: višekratnik haploidnog broja kromosoma (n) osim diploidnog broja (tj. $3n$, $4n$ itd.).

Strukturna aberacija: promjena u strukturi kromosoma koja se može otkriti mikroskopskim pregledom diobe stanica u metafazi, zapažena kao delecije i fragmenti, zamjene.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

UVCB: kemijske tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.,"

(5) u dijelu B poglavlje B.40. zamjenjuje se sljedećim:

„B.40. NAGRIZANJE KOŽE *IN VITRO*: ISPITNA METODA TRANSKUTANOG ELEKTRIČNOG OTPORA (TER)

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 430 (2015.). Nagrizanje kože odnosi se na izazivanje ireverzibilnog oštećenja kože koje se manifestira kao vidljiva nekroza koja kroz epidermu prodire u dermu nakon primjene ispitivane kemikalije [kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označavanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označavanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) ⁽¹⁾ Europske unije]. Ova ažurirana ispitna metoda B.40. pruža *in vitro* postupak kojim se omogućuje utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih tvari i smjesa u skladu s UN GHS-om (1.) i CLP-om.
2. Procjena nagrizajućeg djelovanja na kožu obično je obuhvaćala primjenu laboratorijskih životinja (ispitna metoda B.4., ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 404 koja je izvorno donesena 1981. i revidirana 1992., 2002. i 2015.) (2.). Uz sadašnju ispitnu metodu B.40., validirane su i donesene druge ispitne metode *in vitro* za ispitivanje potencijala kemikalija da uzrokuju nagrizanje kože, kao što su ispitna metoda B.40.bis (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 431) (3.) i ispitna metoda B.65. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 435) (4.), kojima se mogu utvrditi i potkategorije korozivnih kemikalija ako je potrebno. Doneseno je nekoliko validiranih ispitnih metoda *in vitro*, kao što je ispitna metoda B.46. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 439 (5.)), koje treba upotrebljavati za ispitivanje nadraživosti kože. U Smjernicama OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nagrizanje i nadraživanje kože opisano je nekoliko modula u kojima se grupiraju različiti izvori informacija i alati za analizu te se pružaju smjernice o i. načinu integriranja i uporabe postojećih podataka o ispitivanju i podataka koji se dobivaju bez ispitivanja za procjenu potencijala kemikalija da uzrokuju nadraživanje i nagrizanje kože te ii. predlaganju pristupa kad je potrebno daljnje ispitivanje (6.).
3. Ova se ispitna metoda bavi konačnim učinkom nagrizanja kože na zdravlje ljudi. Temelji se na ispitnoj metodi transkutanog električnog otpora (TER) na koži štakora kod koje se upotrebljavaju diskovi kože kako bi se identificirale nagrizajuće tvari prema njihovoj sposobnosti da dovedu do gubitka integriteta i funkcije barijere normalnog *stratum corneum*. Odgovarajuća smjernica OECD-a za ispitivanje izvorno je donesena 2004. i ažurirana je 2015. kako bi se odnosila na smjernice o IATA-i.
4. Kako bi se u regulatorne svrhe ocijenilo *in vitro* ispitivanje nagrizanja kože provedene su predvalidacijske studije (7.) nakon čega je slijedila službena validacijska studija ispitne metode TER-a na koži štakora za procjenu nagrizanja kože (8., 9., 10. i 11.). Rezultati tih studija doveli su do preporuke da bi se ispitna metoda TER-a (imenovana validiranom referentnom metodom) mogla upotrebljavati u regulatorne svrhe za procjenu *in vivo* nagrizajućeg djelovanja na kožu (12., 13. i 14.).
5. Prije nego što se predložena slična ili izmijenjena ispitna metoda TER-a *in vitro* za nagrizanje kože, koja nije validirana referentna metoda, može upotrijebiti u regulatorne svrhe, trebalo bi utvrditi njezinu pouzdanost, relevantnost (točnost) i ograničenja za njezinu predloženu uporabu kako bi se osigurala njezina sličnost s validiranom referentnom metodom, u skladu sa zahtjevima izvedbe (15.). OECD-ovo uzajamno prihvatanje podataka jamčit će se samo nakon što se svaka predložena nova ili ažurirana ispitna metoda koja je u skladu sa zahtjevima izvedbe pregleda i uključi u odgovarajuću smjernicu OECD-a za ispitivanje.

DEFINICIJE

6. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku.

POČETNA RAZMATRANJA

7. Validacijskom studijom (10.) i drugim objavljenim studijama (16. i 17.) utvrđeno je da se ispitnom metodom TER-a na koži štakora mogu razlikovati poznate tvari s nagrizajućim djelovanjem na kožu od tvari koje na kožu ne djeluju nagrizajuće uz ukupnu osjetljivost od 94 % (51/54) i specifičnost od 71 % (48/68) za bazu podataka od 122 tvari.

⁽¹⁾ Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označavanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006, SL L 353/1, 31.12.2008.

8. Ova se ispitna metoda bavi nagrizanjem kože *in vitro*. Omogućuje identifikaciju ispitivanih kemikalija koje ne djeluju nagrizajuće i onih koje djeluju nagrizajuće u skladu s UN GHS-om ili CLP-om. Ograničenje ove ispitne metode, kako je pokazano validacijskim studijama (8., 9., 10. i 11.), jest to što ne omogućuje daljnje razvrstavanje nagrizajućih tvari i smjesa u skladu s UN GHS-om ili CLP-om. Primjenjivim regulatornim okvirom utvrdit će se način upotrebe ove ispitne metode. Iako se ovom ispitnom metodom ne dobivaju primjerene informacije o nadraživanju kože, trebalo bi napomenuti da se ispitna metoda B.46. posebno bavi učinkom koji nadraživanje kože *in vitro* ima na zdravlje (5.). Za potpunu evaluaciju lokalnih učinaka na kožu nakon jednostrukog dermalnog izlaganja potrebno je proučiti Smjernice OECD-a o IATA-i (6.).
9. Tijekom validacijske studije na kojoj se temelji ova ispitna metoda ispitan je širok raspon kemikalija koje uglavnom čine tvari, a empirijskom bazom podataka validacijske studije bilo je obuhvaćeno 60 tvari koje su obuhvaćale širok raspon kemijskih razreda (8. i 9.). Na temelju svih podataka koji su dostupni, ispitna metoda primjenjiva je na širok raspon kemijskih razreda i agregatnih stanja, uključujući tekućine, polukrute i krute tvari te voskove. Međutim, budući da za posebna agregatna stanja nisu lako raspoložive ispitivane stavke s odgovarajućim referentnim podacima, trebalo bi napomenuti da je tijekom validacije procijenjen relativno malen broj voskova i nagrizajućih krutih tvari. Tekućine mogu biti vodene i bezvodne; krute tvari mogu biti topljive ili netopljive u vodi. U slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije tvari, tu ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju tvari. Osim toga, pretpostavlja se da se ova ispitna metoda može primijeniti na smjese kao proširenje njezine primjenjivosti na tvari. Međutim, budući da smjese obuhvaćaju široki spektar kategorija i sastava te da su trenutačno dostupne samo ograničene informacije o ispitivanju smjesa, u slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije smjesa (npr. primjenom strategije koju su predložili Eskes i dr., 2012.) (18.), ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Plinovi i aerosoli još nisu ocijenjeni u validacijskim studijama (8. i 9.). Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom ispitne metode TER-a, trenutačnom ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje plinova i aerosola.

NAČELO ISPITIVANJA

10. Ispitivana kemikalija primjenjuje se u trajanju do 24 sata na epidermalne površine diskova kože u dvodijelnom ispitnom sustavu u kojem diskovi kože djeluju kao pregrada između dva odjeljka. Diskovi kože uzeti su od humano usmrćenih štakora u dobi od 28 do 30 dana. Nagrizajuće kemikalije identificirane su prema sposobnosti da dovedu do gubitka integriteta i funkcije barijere normalnog *stratum corneum*, što se mjeri kao smanjenje TER vrijednosti ispod razine praga (16.) (vidjeti stavak 32.). Za TER vrijednosti za kožu štakora, vrijednost praga u iznosu od 5 kΩ odabrana je na temelju mnogobrojnih podataka za širok raspon tvari kod kojih je velika većina vrijednosti jasno bila ili znatno iznad (često > 10 kΩ), ili znatno ispod (često < 3 kΩ) te vrijednosti (16.). Općenito, ispitivane kemikalije koje na životinje ne djeluju nagrizajuće, već su nadražujuće ili nenadražujuće, ne smanjuju TER ispod te vrijednosti praga. Nadalje, uporaba drugih preparata kože ili druge opreme može modificirati vrijednost praga, što znači da je potrebna dodatna validacija.
11. U ispitni postupak ugrađena je i faza vezanja boje kojom se potvrđuju pozitivni rezultati za TER u vrijednostima od približno 5 kΩ. Postupkom vezanja boje određuje se može li se povećanje ionske permeabilnosti pripisati fizičkom uništenju *stratum corneum*. Pokazalo se da se TER metodom uz primjenu kože štakora može predvidjeti nagrizajuće djelovanje *in vivo* kod kunića koji su procjenjivani ispitnom metodom B.4. (2.).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

12. Prije rutinske upotrebe ispitne metode TER-a na koži štakora koja je u skladu s ovom ispitnom metodom laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost pravilnim utvrđivanjem kategorije dvanaest tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti koje su preporučene u tablici 1. U slučajevima u kojima nije dostupna navedena tvar ili ako je to opravdano, može se upotrijebiti druga tvar za koju su dostupni primjereni referentni *in vivo* i *in vitro* podaci (npr. s popisa referentnih kemikalija (16.)) pod uvjetom da se primjenjuju isti kriteriji za odabir kao oni opisani u tablici 1.

Tablica 1.

Popis tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti ⁽¹⁾

Tvar	CAS br.	Kemijski razred ⁽²⁾	Kat. sustava UN GHS-a ili CLP-a na temelju <i>in vivo</i> rezultata ⁽³⁾	Kat. VRM-a na temelju <i>in vitro</i> rezultata	Agregatno stanje	pH ⁽⁴⁾
Tvari koje djeluju nagrizajuće <i>in vivo</i>						
N,N'-dimetil dipropilentriamin	10563-29-8	organska baza	1.A	6 × C	Tekuće	8,3
1,2-diaminopropan	78-90-0	organska baza	1.A	6 × C	Tekuće	8,3
Sumporna kiselina (10 %)	7664-93-9	anorganska kiselina	(1.A)/1.B/1.C	5 × C 1 × NC	Tekuće	1,2
Kalijev hidroksid (10 % aq.)	1310-58-3	anorganska baza	(1.A)/1.B/1.C	6 × C	Tekuće	13,2
Oktanska (kaprilna) kiselina	124-07-2	organska kiselina	2.B/1.C	4 × C 2 × NC	Tekuće	3,6
2-tert-butilfenol	88-18-6	fenol	2.B/1.C	4 × C 2 × NC	Tekuće	3,9
Tvari koje ne djeluju nagrizajuće <i>in vivo</i>						
Izostearinska kiselina	2724-58-5	organska kiselina	NC	6 × NC	Tekuće	3,6
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	organska baza	NC	6 × NC	Kruto	5,5
Fenetil bromid	103-63-9	elektrofil	NC	6 × NC	Tekuće	3,6
4-(metiltio)-benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	NC	6 × NC	Tekuće	6,8
1,9-dekadien	1647-16-1	neutralne organske kemikalije	NC	6 × NC	Tekuće	3,9
Tetrakloretilen	127-18-4	neutralne organske kemikalije	NC	6 × NC	Tekuće	4,5

Kratice: aq. = vodena otopina; CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; VRM = validirana referentna metoda; C = nagrizajuće; NC = nije nagrizajuće.

⁽¹⁾ Tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti, prvo razvrstane na tvari koje djeluju nagrizajuće i one koje ne djeluju nagrizajuće, zatim prema potkategoriji nagrizanja i potom kemijskom razredu, odabrane su među tvarima koje su upotrijebljene u ECVAM-ovoj validacijskoj studiji ispitne metode TER-a na koži štakora (8. i 9.). Osim ako je drukčije navedeno, tvari su ispitane na razini čistoće koja se dobiva kad se kupe od komercijalnog izvora (8.). Odabir je uključivao, u mjeri u kojoj je to moguće, tvari: i. koje su reprezentativne za raspon nagrizajućih odgovora (npr. tvari koje ne djeluju nagrizajuće; tvari sa slabim do jakim nagrizajućim djelovanjem) koji se mogu izmjeriti ili predvidjeti validiranom referentnom metodom; ii. koje su reprezentativne za kemijske razrede koji su korišteni u validacijskoj studiji; iii. koje odražavaju svojstva učinkovitosti validirane referentne metode; iv. koje imaju dobro utvrđene kemijske strukture; v. koje induciraju konačne rezultate u *in vivo* referentnoj ispitnoj metodi; vi. koje su komercijalno dostupne; i vii. koje nisu povezane s neprimjereno visokim troškovima zbrinjavanja.

⁽²⁾ Kemijski razred koji su dodijelili Barratt i dr. (8.).

⁽³⁾ Odgovarajuće ambalažne skupine UN-a I., II. i III. za kategorije 1.A, 1.B odnosno 1.C UN GHS-a ili CLP-a.

⁽⁴⁾ pH-vrijednosti dobivene su iz Fentem i dr. (9.) te Barratt i dr. (8.).

POSTUPAK

13. Dostupni su standardni operativni postupci za ispitne metode TER-a na koži štakora za ispitivanje nagrizanja kože (19). Ispitne metode TER-a na koži štakora obuhvaćene ovom ispitnom metodom trebale bi biti u skladu sa sljedećim uvjetima.

Životinje

14. Trebali bi se upotrebljavati štakori jer je osjetljivost njihove kože na tvari u ovoj ispitnoj metodi prethodno dokazana (12.) te je jedini izvor kože koji je službeno validiran (8. i 9.). Dob (u kojoj se koža prikuplja) i soj štakora posebno su važni kako bi se osiguralo da folikuli dlake budu u latentnoj fazi prije početka rasta odraslih dlaka.
15. Dlake na leđima i bokovima mladih, približno 22 dana starih mužjaka ili ženki štakora (soja Wistar ili nekog usporedivog soja) pažljivo se ukloni malim škarama. Životinje se zatim operu nježnim brisanjem, a ošišana se površina umoči u antibiotsku otopinu (koja sadržava, primjerice, streptomycin, penicilin, kloramfenikol i amfotericin u koncentracijama koje su učinkovite u inhibiciji rasta bakterija). Životinje se ponovno operu antibioticima trećeg ili četvrtog dana nakon prvog pranja i koriste u roku od tri dana nakon drugog pranja, kad se *stratum corneum* oporavi od odstranjivanja dlake.

Priprema diskova kože

16. Životinje se humano usmrte kad su stare 28–30 dana; ta je dob veoma važna. Sa svake životinje odstrani se bočna koža na leđima s koje se opreznim ljuštenjem oguli prekomjerna potkožna mast. Odstrane se diskovi kože, u promjeru svaki približno 20 mm. Prije uporabe diskova koža se može skladištiti ako se pokaže da su podaci za pozitivnu i negativnu kontrolu istovjetni podacima dobivenima sa svježom kožom.
17. Po jedan disk stavi se preko jednog kraja teflonske (politetrafluoretilenske) cijevi, osiguravajući da je epidermalna površina u dodiru s cijevi. Gumeni O-prsten pritisne se preko ruba cijevi kako bi se učvrstila koža, a višak tkiva se odreže. Gumeni O-prsten zatim se dužinom ruba teflonske cijevi oprezno zabrtvi petrolejskim gelom. Cijev se uvede u prihvatnu komoru koja sadržava otopinu MgSO_4 (154 mM) u kojoj je pridržava opružna štipaljka (slika 1.). Disk kože treba potpuno potopiti u otopinu MgSO_4 . Od kože jednog štakora može se dobiti čak 10–15 diskova kože. Dimenzije cijevi i O-prstena prikazane su na slici 2.
18. Prije početka ispitivanja mjeri se TER na dva kožna diska kao postupak kojim se kontrolira kvaliteta kože svake životinje. Kako bi se preostali diskovi te kože mogli koristiti u ispitnoj metodi, oba kontrolna diska moraju dati vrijednosti električnog otpora veće od 10 k Ω . Ako je vrijednost otpora manja od 10 k Ω , preostale diskove te kože treba baciti.

Primjena ispitivane kemikalije i kontrolnih tvari

19. Za svaki ciklus (pokus) treba koristiti istodobne pozitivne i negativne kontrole kako bi se osigurala odgovarajuća uspješnost pokusnog modela. Za svaki ciklus (pokus) treba koristiti diskove kože jedne životinje. Kao ispitivane kemikalije pozitivne i negativne kontrole predlažu se 10 M klorovodična kiselina odnosno destilirana voda.
20. Tekuće ispitivane kemikalije (150 μl) primjenjuju se ravnomjerno na epidermalnu površinu unutar cijevi. Kod ispitivanja krutih materijala, dovoljna količina krute tvari primjenjuje se ravnomjerno na disk kako bi se osigurala pokrivenost cijele epiderme. Na krutu tvar dodaje se deionizirana voda (150 μl) i cijev se pažljivo protrese. Za postizanje maksimalnog dodira s kožom, krute tvari možda treba zagrijati na 30 °C kako bi se ispitivana tvar rastopila ili omekšala ili samljati kako bi se dobio zrnati materijal ili prah.

21. Za svako ispitivanje i kontrolnu kemikaliju koriste se tri diska kože u svakom ciklusu ispitivanja (pokusu). Ispitivane kemikalije primjenjuju se 24 sata na temperaturi 20–23 °C. Ispitivana kemikalija uklanja se ispiranjem pod mlazom vode iz slavine čija temperatura nije viša od sobne temperature sve dok se ne odstrani sav materijal.

Mjerenja transkutanog električnog otpora (TER)

22. Impedancija kože mjeri se kao transkutani električni otpor (TER) upotrebom Wheatstoneova mjernog mosta na niskonaponsku izmjeničnu struju (18.). Opće su specifikacije mosta radni napon 1–3 volta, izmjenična struja sinusnog ili pravokutnog oblika 50–1 000 Hz i mjerno područje od najmanje 0,1–30 kΩ. Mjerni most koji je korišten u validacijskoj studiji mjerio je induktivitet, kapacitivnost i otpor do vrijednosti 2 000 H, 2 000 μF odnosno 2 MΩ, kod frekvencija od 100 Hz ili 1 kHz, primjenom serijskih ili paralelnih vrijednosti. U svrhu testa otkrivanja nagrizajućeg djelovanja, mjerenja transkutanog električnog otpora bilježe se pri frekvenciji od 100 Hz primjenom serijskih vrijednosti. Prije mjerenja električnog otpora, površinska napetost kože smanjuje se dodavanjem dovoljnog volumena 70-postotnog etanola koji se nanosi na epidermu. Nakon nekoliko sekundi etanol se uklanja iz cijevi, a tkivo se hidratizira dodavanjem 3 ml otopine MgSO₄ (154 mM). Elektrode mjernog mosta postavljaju se na obje strane diska kože kako bi se izmjerio otpor u kΩ/disk kože (slika 1.). Dimenzije elektrode i duljina elektrode izložene ispod krokodilskih štipaljki prikazane su na slici 2. Štipaljka na unutarnjoj elektrodi za vrijeme mjerenja otpora stoji na vrhu teflonske cijevi kako bi se osiguralo da u otopinu MgSO₄ bude uronjena stalno ista duljina elektrode. Vanjska elektroda postavlja se unutar komore na način da stoji na dnu komore. Razmak između opružne štipaljke i dna teflonske cijevi održava se nepromjenjivim (slika 2.) jer ta udaljenost utječe na dobivene vrijednosti otpora. Zbog toga, razmak između unutarnje elektrode i diska kože treba biti nepromjenjiv i minimalan (1–2 mm).
23. Ako je izmjerena vrijednost otpora veća od 20 kΩ, to može biti posljedica preostalog sloja ispitivane kemikalije na epidermalnoj površini diska kože. Ponovno treba pokušati ukloniti taj sloj, primjerice, tako da se teflonska cijev zatvori pritiskom prsta zaštićenog rukavicom i protrese približno deset sekundi; otopina MgSO₄ baca se i mjerenje otpora ponavlja se s novom otopinom MgSO₄.
24. Svojstva i dimenzije ispitnog uređaja i primijenjen ispitni postupak mogu utjecati na dobivene vrijednosti transkutanog električnog otpora. Prag od 5 kΩ za nagrizajuće djelovanje određen je iz podataka dobivenih konkretnim uređajem i postupkom opisanim u ovoj ispitnoj metodi. Ako se ispitni uvjeti izmijene ili se primijeni drukčiji uređaj, mogu vrijediti drugačiji pragovi i kontrolne vrijednosti. Stoga je potrebno kalibrirati metodologiju i vrijednosti praga otpora ispitivanjem niza tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti odabranih među tvarima koje su korištene u validacijskoj studiji (8. i 9.) ili kemikalijama koje su iz kemijski sličnih razreda kao tvari koje se istražuju. Niz odgovarajućih tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti utvrđen je u tablici 1.

Metode vezanja boje

25. Izlaganje određenih nenagrizajućih materijala može rezultirati smanjenjem otpora na vrijednost ispod praga od 5 kΩ koja dopušta prolazak iona kroz *stratum corneum*, čime se električni otpor smanjuje (9.). Na primjer, neutralne organske tvari i tvari koje imaju površinski aktivna svojstva (uključujući deterdžente, emulgatore i druge površinski aktivne tvari) mogu iz kože odstraniti lipide i time povećati propusnost barijere za ione. Znači, ako su vrijednosti TER-a koje proizvode te kemikalije manje od 5 kΩ ili približno 5 kΩ bez vidljivog oštećenja diskova kože, na kontrolnom i tretiranom tkivu treba provesti procjenu penetracije boje kako bi se odredilo jesu li te dobivene vrijednosti TER rezultat povećane propusnosti kože ili nagrizanja kože (7. i 9.). Ako se radi o nagrizajućem djelovanju, odnosno o pucanju *stratum corneum*, boja sulforodamin B, kad se nanese na površinu kože, brzo prodire i boji potkožno tkivo. Ta konkretna boja stabilna je na širok raspon tvari i na nju ne utječe postupak ekstrakcije opisan u nastavku.

Primjena i odstranjivanje boje sulforodamina B

26. Nakon procjene vrijednosti TER, magnezijev sulfat evakuira se iz cijevi i koža se pažljivo pregleda s obzirom na vidljiva oštećenja. Ako nema očitih velikih oštećenja (npr. perforacija), 150 μl 10-postotne (w/v) otopine boje sulforodamina B (Acid Red 52; C.I. 45100; CAS broj 3520-42-1) u destiliranoj vodi primjenjuje se na epidermalnu površinu svakog diska kože tijekom dva sata. Zatim se ti diskovi kože približno deset sekundi ispiru

vodom iz slavine čija temperatura nije viša od sobne temperature kako bi se time uklonio višak boje ili nevezana boja. Svaki disk kože oprezno se skine s teflonske cijevi i stavi u tikvicu (npr. tikvicu od 20 ml za scintilaciju) koja sadržava deioniziranu vodu (8 ml). Tikvice se nježno tresu pet minuta kako bi se odstranila eventualna preostala nevezana boja. Zatim se ponavlja postupak ispiranja, nakon kojega se diskovi kože skidaju i stavljaju u tikvice koje sadržavaju 5 ml 30-postotnog (w/v) natrijevog dodecil-sulfata (SDS) u destiliranoj vodi i ostave se inkubirati preko noći na 60 °C.

27. Nakon inkubacije, svaki disk kože skida se i baca, a preostala otopina centrifugira se osam minuta na 21 °C (relativna centrifugalna sila $\sim 175 \times g$). Uzorak od 1 ml supernatanta razrijedi se u omjeru 1:5 (v/v) [tj. 1 ml + 4 ml] s 30-postotnim (w/v) natrijevim dodecil-sulfatom (SDS) u destiliranoj vodi. Optička gustoća (OD) otopine mjeri se na 565 nm.

Izračun sadržaja boje

28. Sadržaj boje sulforodamin B po disku računa se iz vrijednosti optičke gustoće (OD) (9.) (koeficijent molarne ekstinkcije sulforodamina B na 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekulska masa = 580). Sadržaj boje određuje se za svaki disk kože primjenom odgovarajuće kalibracijske krivulje, zatim se za ponovljene pokuse izračunava srednja vrijednost sadržaja boje.

Kriteriji prihvatljivosti

29. Srednji rezultati TER vrijednosti prihvatljivi su ako su vrijednosti istodobne pozitivne i negativne kontrole unutar prihvatljivih raspona za predmetnu laboratorijsku metodu ispitivanja. Prihvatljivi rasponi otpora za metodologiju i uređaj iz prethodnog teksta navedeni su u sljedećoj tablici:

Kontrola	Tvar	Raspon otpora (kΩ)
Pozitivna	10 M klorovodična kiselina	0,5–1,0
Negativna	Destilirana voda	10–25

30. Srednji rezultati vezanja boje prihvatljivi su pod uvjetom da su vrijednosti istodobne kontrole unutar prihvatljivih raspona za predmetnu metodu. Predloženi prihvatljivi rasponi sadržaja boje za kontrolne tvari za metodologiju i uređaj iz prethodnog teksta navedeni su u sljedećoj tablici:

Kontrola	Tvar	Raspon sadržaja boje (μg/disku)
Pozitivna	10 M klorovodična kiselina	40–100
Negativna	Destilirana voda	15–35

Tumačenje rezultata

31. Granična vrijednost TER-a koja služi za razlikovanje nagrizajućih od nenagrizajućih ispitivanih kemikalija utvrđena je tijekom optimizacije ispitne metode, ispitana tijekom predvalidacijske faze i potvrđena u službenoj validacijskoj studiji.
32. Model predviđanja za ispitnu metodu TER-a na koži štakora za ispitivanje nagrizanja kože (9. i 19.), povezan sa sustavom razvrstavanja UN GHS-om ili CLP-om naveden je u nastavku.

Ispitivana kemikalija ne smatra se nagrizajućom za kožu:

- i) ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu kemikaliju veća od ($>$) 5 k Ω ; ili
- ii) ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu kemikaliju manja od ili jednaka ($\leq$) 5 k Ω ; i
 - ako diskovi kože ne pokazuju vidljivo oštećenje (npr. perforaciju), i
 - ako je srednja vrijednost sadržaja boje diska manja od ($<$) srednje vrijednosti sadržaja boje diska iz istodobne pozitivne kontrole s 10 M HCl (vidjeti stavak 30. za vrijednosti pozitivne kontrole).

Ispitivana kemikalija smatra se nagrizajućom za kožu:

- i) ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu kemikaliju manja od ili jednaka ($\leq$) 5 k Ω i ako su diskovi kože vidljivo oštećeni (npr. perforirani); ili
 - ii) ako je srednja vrijednost TER-a postignuta za ispitivanu kemikaliju manja od ili jednaka ($\leq$) 5 k Ω i:
 - ako diskovi kože ne pokazuju vidljivo oštećenje (npr. perforaciju), ali
 - srednja vrijednost sadržaja boje diska veća je ili jednaka ($\geq$) srednjoj vrijednosti sadržaja boje diska iz istodobne pozitivne kontrole s 10 M HCl (vidjeti stavak 30. za vrijednosti pozitivne kontrole).
33. Ciklus ispitivanja (pokusi) koji obuhvaća najmanje tri ponovljena diska kože trebao bi biti dovoljan za ispitivanu kemikaliju ako je razvrstavanje nedvosmisleno. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja i/ili srednja vrijednost TER-a od $5 \pm 0,5$ k Ω , trebalo bi razmotriti drugi neovisni ciklus ispitivanja (pokusi), a i treći ciklus u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva ciklusa ispitivanja (pokusa).

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

34. Po mogućnosti, vrijednosti otpora (k Ω) i vrijednosti sadržaja boje (μ g/disku) za ispitivanu kemikaliju te za pozitivne i negativne kontrole treba zabilježiti u tabličnom obliku, uključujući podatke za svaki pojedinačni ponovljeni disk u svakom ciklusu ispitivanja (pokusu) i srednje vrijednosti $\pm$ standardno odstupanje. Treba zabilježiti sve ponovljene pokuse. Uočeno oštećenje na diskovima kože trebalo bi zabilježiti za svaku ispitivanu kemikaliju.

Izvjешće o ispitivanju

35. Izvjешće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija i kontrolne tvari:

- tvar s jednim sastojkom: kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

- tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa: opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka,
- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- izvor, broj serije, ako su dostupni,
- tretiranje ispitivane kemikalije/kontrolne tvari prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),
- stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,
- uvjeti skladištenja.

Ispitne životinje:

- soj i spol koji je upotrijebljen,
- dob životinja kad su upotrijebljene kao donorske životinje,
- podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,
- pojedinosti o preparatu kože.

Ispitni uvjeti:

- kalibracijske krivulje za ispitni uređaj,
- kalibracijske krivulje za provođenje testa vezanja boje, pojas koji se upotrebljava za mjerenje optičke gustoće (OD) i raspon linearnosti OD-a uređaja za mjerenje (npr. spektrofotometra), ako je primjereno,
- pojedinosti o ispitnom postupku upotrijebljenom za mjerenja TER-a,
- pojedinosti o ispitnom postupku za procjenu vezivanja boje, ako je primjereno,
- upotrijebljene ispitne doze, trajanje razdoblja izlaganja i temperature izlaganja,
- pojedinosti o postupku ispiranja upotrijebljenom nakon razdoblja izlaganja,
- broj ponovljenih diskova kože upotrijebljenih po ispitivanoj kemikaliji i kontrolama (pozitivna i negativna kontrola),
- opis svih izmjena ispitnog postupka,

— upućivanje na prijašnje podatke za predmetni model. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:

- i) prihvatljivost vrijednosti TER-a pozitivnih i negativnih kontrola (u k_l) u odnosu na raspone otpora pozitivnih i negativnih kontrola;
- ii) prihvatljivost vrijednosti sadržaja boje pozitivnih i negativnih kontrola (u µg/disku) u odnosu na raspone sadržaja boje pozitivnih i negativnih kontrola;
- iii) prihvatljivost rezultata ispitivanja u odnosu na prijašnju varijabilnost među ponovljenim diskovima kože,

— opis primijenjenih kriterija za odlučivanje/modela predviđanja.

Rezultati:

- tablični podaci iz testova za utvrđivanje vrijednosti TER-a i vezivanja boje (ako je primjereno) za pojedinačne ispitivane kemikalije i kontrole, za svaki ciklus ispitivanja (pokusi) i svaki ponovljeni disk kože (pojedinačne životinje i pojedinačni uzorci kože), srednje vrijednosti, standardne devijacije (SD) i koeficijenti varijacije (CV),
- opis svih uočenih učinaka,
- utvrđeno razvrstavanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterije odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

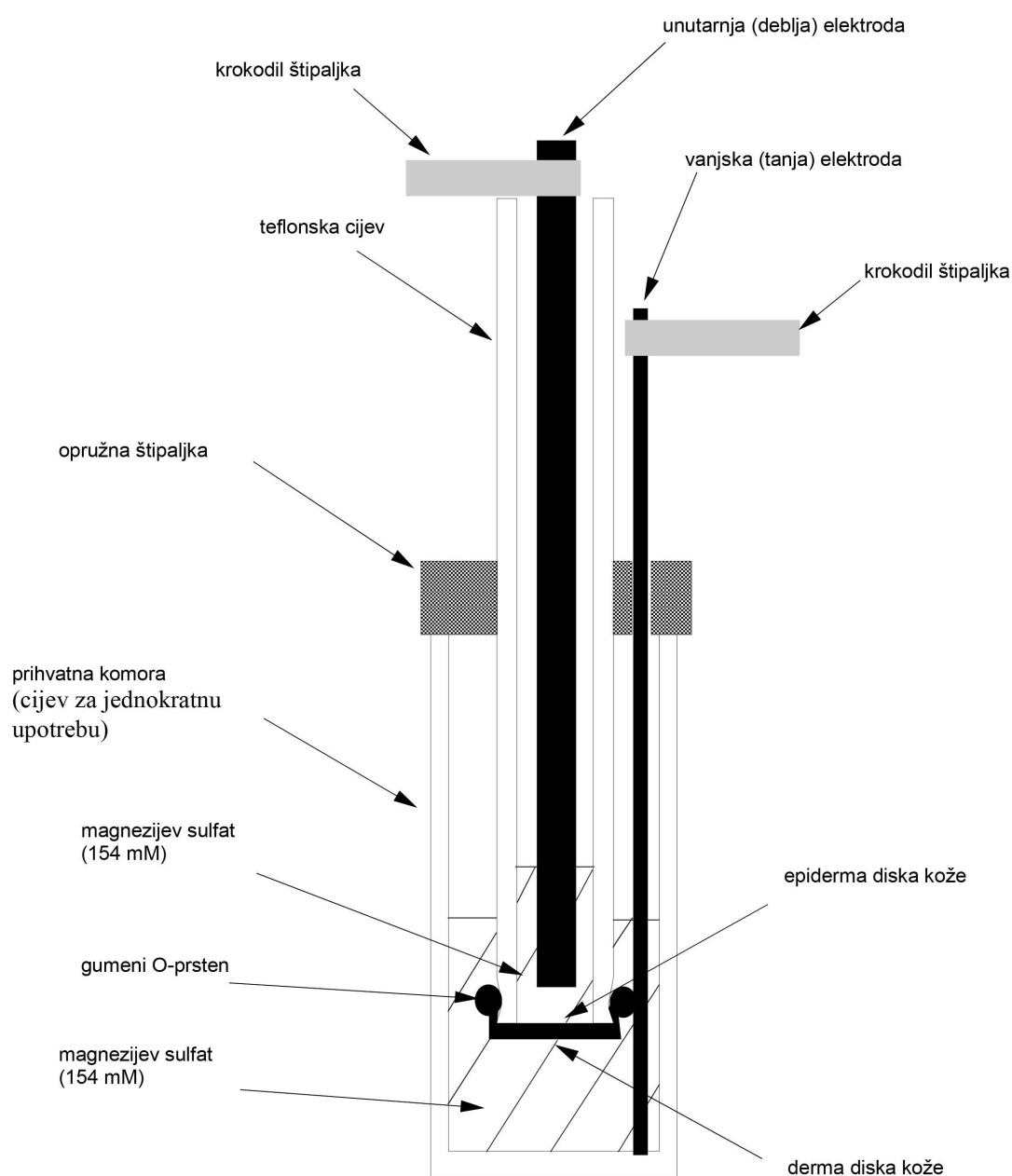
1. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York i Ženeva, 2013. Dostupno na: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].
2. Poglavlje B.4. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje kože.
3. Poglavlje B.40.bis ovog Priloga, Model kože *in vitro*.
4. Poglavlje B.65. ovog Priloga, *In vitro* ispitna metoda s membranskom barijerom.
5. Poglavlje B.46. ovog Priloga, Nadraživanje kože *in vitro*: ispitna metoda na modelu rekonstruirane ljudske epiderme.
6. OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

7. Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219.–255.
8. Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic. In Vitro* 12, 471.–482.
9. Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic. In Vitro* 12, 483.–524.
10. Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillozo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23, 129.–147.
11. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, SAD.
12. EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3. travnja 1998.
13. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* 26, 275.–280.
14. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, SAD.
15. OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
16. Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 507.–512.
17. Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6, 191.–194.
18. Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüscheweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol. Pharmacol.* 62, 393.–403.

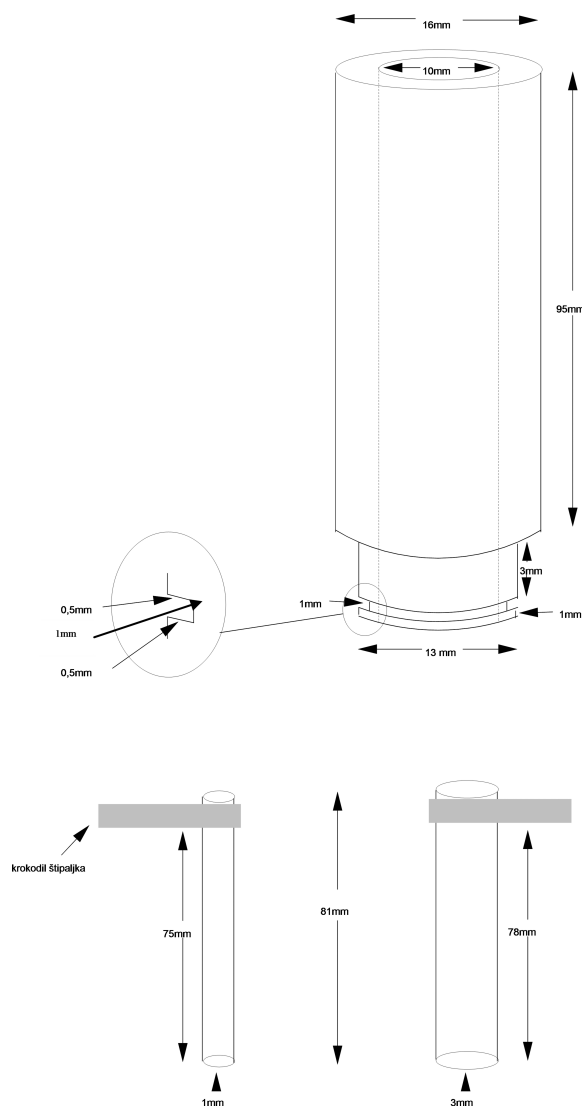
19. TER SOP (December 2008). INVITTOX Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.
20. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 34), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

Slika 1.

Redaj za Test Transkutanog Električnog Otpora (TER) na Koži Štakora



Slika 2.

Dimenzije Upotrijebljene Teflonske (Politetrafluoretilenske – PTFE) I Prihvatne Cijevi i Elektroda**Kritički faktori uređaja prikazanog na gornjoj slici:**

- unutarnji promjer teflonske (PTFE) cijevi,
- duljina elektroda u odnosu na teflonsku i prihvatnu cijev; duljina bi trebala biti takva da elektrode ne dodiruju disk kože i da je elektrode pri standardnoj duljini u dodiru s otopinom MgSO_4 ,
- količina otopine MgSO_4 u prihvatnoj cijevi trebala bi omogućiti dubinu tekućine u odnosu na razinu u teflonskoj cijevi, kako je prikazano na slici 1.,
- disk kože treba biti dobro pričvršćen na teflonsku cijev, kako bi izmjereni električni otpor vjerno odražavao svojstva kože.

Dodatak

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (20.).

C: nagrizajuće.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Podudarnost: mjerilo učinkovitosti ispitne metode za ispitne metode koje daju kategorijski rezultat i jedan je od aspekata relevantnosti. Pojam je ponekad međusobno zamjenjiv s pojmom točnosti i definira se kao udio svih ispitanih kemikalija koje su pravilno razvrstane kao pozitivne ili negativne. Podudarnost u velikoj mjeri ovisi o prisutnosti pozitivnih rezultata u vrstama ispitivane kemikalije (20.).

GHS (Globalno usklađeni sustav razvrstavanja i označivanja kemikalija (UN)): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti te opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (1.).

IATA: integrirani pristup ispitivanju i procjeni.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % (w/w) ili većoj te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

NC: nije nagrizajuće.

OD: optička gustoća.

PC: pozitivna kontrola; ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da inducira pozitivan odgovor. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Zahtjevi izvedbe (PS): zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Uključuju: i. ključne elemente ispitne metode; ii. minimalni popis referentnih kemikalija odabranih među kemikalijama koje se upotrebljavaju za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode; te iii. slične razine pouzdanosti i točnosti, utemeljene na rezultatima dobivenim za validiranu ispitnu metodu, koje se prilikom ocjenjivanja trebaju dokazati predloženom ispitnom metodom koristeći minimalni popis referentnih kemikalija.

Relevantnost: opis odnosa između ispitne metode i istraživanog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitnom metodom točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitne metode (20.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija (20.).

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (20.).

Nagrizanje kože in vivo: uzrokovanje ireverzibilnog oštećenja kože, točnije, vidljive nekroze koja kroz epidermu prodire u dermu nakon što je ispitivana kemikalija primjenjivana u trajanju do najviše četiri sata. Za nagrizanje kože tipična je pojava čireva, krvarenja, krvavih krasta te, do kraja opažanja od 14 dana, gubitak boje kože zbog nestajanja pigmenta, cijele površine zahvaćene alopecijom (gubitak dlake) i ožiljci. Za ocjenjivanje sumnjivih lezija treba razmotriti mogućnost histopatoloških pretraga.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (20.).

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnom stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Ciklus (ispitivanja): jedna ispitivana kemikalija koja se istodobno ispituje na najmanje tri ponovljena diska kože.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Transkutani električni otpor (TER): mjera električne impedancije kože, izražena kao vrijednost otpora u kiloomima. Jednostavna, robusna metoda za procjenu funkcije barijere bilježenjem prolazaka iona kroz kožu primjenom Wheatstoneova mosta.

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi ili biološki materijali;”

(6) u dijelu B poglavlje B.40.bis zamjenjuje se sljedećim:

„B.40.bis **NAGRIZANJE KOŽE IN VITRO: ISPITNA METODA NA MODELU REKONSTRUIRANE LJUDSKE EPIDERME (RhE)**

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 431 (2016.). Nagrizanje kože odnosi se na izazivanje ireverzibilnog oštećenja kože koje se manifestira kao vidljiva nekroza koja kroz epidermu prodire u dermu nakon primjene ispitivane kemikalije [kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) ⁽¹⁾ Europske unije]. Ova ažurirana ispitna metoda B.40.bis pruža *in vitro* postupak kojim se omogućuje utvrđivanje nagrizaćućih i nenagrizaćućih tvari i smjesa u skladu s UN GHS-om i CLP-om. Omogućuje i djelomično daljnje razvrstavanje nagrizaćućih tvari.
2. Procjena potencijala kemikalija da uzrokuju nagrizanje kože obično je uključivala upotrebu laboratorijskih životinja (ispitna metoda B.4., ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 404; izvorno donesena 1981. i revidirana 1992., 2002. i 2015.) (2.). Uz sadašnju ispitnu metodu B.40.bis validirane su i donesene još dvije ispitne metode *in vitro* za ispitivanje potencijala kemikalija da uzrokuju nagrizanje kože – ispitna metoda B.40. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 430) (3.) i ispitna metoda B.65. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 435) (4.). Nadalje, donesena je ispitna metoda *in vitro* B.46. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 439) (5.) za ispitivanje potencijala nadraživanja kože. U Smjernicama OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nagrizanje i nadraživanje kože opisano je nekoliko modula u kojima se grupiraju izvori informacija i alati za analizu te se pružaju smjernice o i. načinu integriranja i uporabe postojećih podataka o ispitivanju i podataka koji se dobivaju bez ispitivanja za procjenu potencijala kemikalija da uzrokuju nadraživanje i nagrizanje kože te ii. predlaganju pristupa kad je potrebno daljnje ispitivanje (6.).
3. Ova se ispitna metoda bavi konačnim učinkom nagrivanja kože na zdravlje ljudi. U njoj se upotrebljava rekonstruirana ljudska epiderma (RhE) (dobivena iz ljudskih netransformiranih epidermalnih keratinocita) koja vjerojatno oponaša histološka, morfološka, biokemijska i fiziološka svojstva gornjih slojeva ljudske kože, tj. epiderme. Odgovarajuća smjernica OECD-a za ispitivanje izvorno je donesena 2004. i ažurirana 2013. kako bi se uključile dodatne ispitne metode u kojima se upotrebljavaju modeli RhE-a i mogućnost upotrebe metoda koje podržavaju daljnje razvrstavanje nagrizaćućih kemikalija, a 2015. je ažurirana radi upućivanja na smjernice o IATA-i i uvođenja alternativnog postupka za mjerenje vijabilnosti.
4. Ova ispitna metoda obuhvaća četiri validirana komercijalno dostupna modela RhE-a. Predvalidacijske studije (7.), nakon kojih je slijedila službena validacijska studija za procjenu nagrivanja kože (8., 9. i 10.), provedene su (11. i 12.) za dva ta komercijalno dostupna ispitna modela – standardni model EpiSkin™ i test nagrizaćućeg djelovanja na kožu EpiDerm™ (EPI-200) (dalje u tekstu „Validirane referentne metode – VRM-ovi”). Ishod tih studija doveo je do preporuke da bi se dvije prethodno navedene validirane referentne metode mogle upotrebljavati u regulatorne svrhe za razlikovanje nagrizaćućih tvari (C) od nenagrizaćućih tvari (NC) i da bi se EpiSkin™ osim toga mogao upotrebljavati za daljnje razvrstavanje nagrizaćućih tvari (13., 14. i 15.). Druga dva komercijalno dostupna ispitna modela RhE za utvrđivanje nagrivanja kože *in vitro* pokazala su rezultate slične validiranoj referentnoj metodi EpiDerm™ u skladu s validacijom na temelju zahtjeva izvedbe (16., 17. i 18.). To su SkinEthic™ RHE ⁽²⁾ i epiCS® (prethodni naziv EST-1000) te se i oni mogu upotrebljavati u regulatorne svrhe za razlikovanje nagrizaćućih tvari od nenagrizaćućih tvari (19. i 20.). Postvalidacijskim studijama koje su proveli proizvođači modela RhE od 2012. do 2014. s poboljšanim protokolom u kojem su ispravljene interferencije neodređene redukcije MTT-a koje uzrokuju ispitivane kemikalije poboljšana je učinkovitost razlikovanja nagrizaćućih i nenagrizaćućih tvari, ali i daljnjeg razvrstavanja nagrizaćućih tvari (21. i 22.). Provedene su daljnje statističke analize postvalidacijskih podataka s modelima EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i EpiCS® kako bi se identificirali alternativni modeli predviđanja koji poboljšavaju prediktivnu sposobnost daljnjeg razvrstavanja (23.).

⁽¹⁾ Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006, SL L 353/1, 31.12.2008.

⁽²⁾ Kratica RhE (= rekonstruirana ljudska epiderma) upotrebljava se za sve modele koji se temelje na tehnologiji RhE. Kratica RHE koja se upotrebljava u kombinaciji s modelom SkinEthic™ znači isto, ali piše se velikim slovima kao dio naziva te specifične ispitne metode, kako je stavljena na tržište.

5. Prije nego što se predložena slična ili izmijenjena ispitna metoda RhE *in vitro* za nagrizanje kože, koja nije validirana referentna metoda, može upotrijebiti u regulatorne svrhe, trebalo bi utvrditi njezinu pouzdanost, relevantnost (točnost) i ograničenja za njezinu predloženu uporabu kako bi se osigurala njezina sličnost s validiranim referentnom metodom, u skladu sa zahtjevima izvedbe (24.) utvrđenima u skladu s načelima Smjernice OECD-a br. 34 (25.). Uzajamno prihvaćanje podataka jamčit će se samo nakon što se svaka predložena nova ili ažurirana ispitna metoda koja je u skladu sa zahtjevima izvedbe pregleda i uključi u odgovarajuću smjernicu za ispitivanje. Ispitni modeli uključeni u tu smjernicu za ispitivanje mogu se upotrijebiti za ispunjavanje zahtjeva zemalja u pogledu rezultata ispitivanja ispitne metode *in vitro* za nagrizanje kože, uz ostvarivanje koristi od uzajamnog prihvaćanja podataka.

DEFINICIJE

6. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA

7. Ova ispitna metoda omogućuje utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih tvari i smjesa u skladu s UN GHS-om i CLP-om. Ovom se ispitnom metodom podržava daljnje razvrstavanje nagrizajućih tvari i smjesa na neobaveznu potkategoriju 1.A, u skladu s UN GHS-om (1.), te kombinaciju potkategorija 1.B i 1.C (21., 22. i 23.). Ograničenje je ove metode to što ne omogućuje razlikovanje potkategorije 1.B i potkategorije 1.C s nagrizajućim djelovanjem na kožu u skladu s UN GHS-om i CLP-om zbog ograničenog skupa poznatih kemikalija iz potkategorije 1.C s nagrizajućim djelovanjem *in vivo*. Ispitnim modelima EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i epiCS® mogu se odrediti daljnje potkategorije (tj. 1.A naspram 1.B i 1.C naspram NC).
8. Širok raspon kemikalija, koje uglavnom čine pojedinačne tvari, ispitan je u validaciji kojom se podupiru ispitni modeli uključeni u ovu ispitnu metodu kada se upotrebljavaju za utvrđivanje nagrizajućih i nenagrizajućih kemikalija; empirijska baza podataka validacijske studije uključivala je 60 kemikalija koje su obuhvaćale širok raspon kemijskih razreda (8., 9. i 10.). Subjekti koji su razvili ispitnu metodu proveli su ispitivanje radi dokazivanja osjetljivosti, specifičnosti, točnosti i obnovljivosti unutar laboratorija testa za daljnje razvrstavanje, a rezultate je pregledao OECD (21., 22. i 23.). Na temelju svih podataka koji su dostupni, ispitna metoda primjenjiva je na širok raspon kemijskih razreda i agregatnih stanja, uključujući tekućine, polukrute i krute tvari te voskove. Tekućine mogu biti vodene i bezvodne; krute tvari mogu biti topljive ili netopljive u vodi. Krute tvari prije primjene treba samljeti u sitni prah kad je god moguće; nije potrebno nikakvo drugo prethodno tretiranje uzorka. U slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitni modeli uključeni u ispitnu metodu ne mogu primijeniti za ispitivanje specifične kategorije ispitivanih kemikalija, te modele ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju ispitivanih kemikalija. Osim toga, pretpostavlja se da se ova ispitna metoda može primijeniti na smjese kao proširenje njezine primjenjivosti na tvari. Međutim, budući da smjese obuhvaćaju široki spektar kategorija i sastava te da su trenutačno dostupne samo ograničene informacije o ispitivanju smjesa, u slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije smjesa (npr. primjenom strategije predložene u 26.), ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Plinovi i aerosoli još nisu ocijenjeni u validacijskim studijama (8., 9. i 10.). Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom tehnologije RhE, trenutačnom ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje plinova i aerosola.
9. Ispitivane kemikalije koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan i ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati vitalnu boju MTT (na MTT formazan) mogu ometati mjerenje vijabilnosti tkiva te se kod njih trebaju upotrebljavati prilagođene kontrole za ispravke. Vrsta prilagođenih kontrola koja može biti potrebna mijenjat će se ovisno o vrsti interferencije koju proizvodi ispitivana kemikalija i postupku koji se upotrebljava za mjerenje MTT formazana (vidjeti stavke 25.–31.).

10. Iako se ovom ispitnom metodom ne dobivaju primjerene informacije o nadraživanju kože, trebalo bi napomenuti da se ispitna metoda B.46. posebno bavi učinkom nadraživosti kože na zdravlje *in vitro* i temelji se na istom ispitnom sustavu RhE uz upotrebu drugog protokola (5.). Za potpunu evaluaciju lokalnih učinaka na kožu nakon jednostrukog dermalnog izlaganja potrebno je proučiti Smjernice OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (6.). Taj pristup IATA obuhvaća provođenje *in vitro* ispitivanja za dokazivanje nagrizajućeg (kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi) i nadražujućeg djelovanja na kožu prije eventualnog provođenja ispitivanja na živim životinjama. Podrazumijeva se da upotreba ljudske kože podliježe nacionalnim i međunarodnim etičkim pitanjima i uvjetima.

NAČELO ISPITIVANJA

11. Ispitivana se kemikalija lokalno nanosi na trodimenzionalni model RhE, koji čine netransformirani ljudski epidermalni keratinociti uzgojeni u svrhu dobivanja višeslojnog, visoko izdiferenciranog modela ljudske epiderme. Sastoji se od organiziranih bazalnih, trnastih i zrnatih slojeva te višeslojnog rožnatog sloja (*stratum corneum*) koji između stanica sadržava lamelarne masne slojeve koji predstavljaju glavne razrede lipida analogne onima koji se susreću *in vivo*.
12. Ispitna metoda RhE temelji se na pretpostavci da nagrizajuće kemikalije mogu penetrirati kroz *stratum corneum* putem difuzije ili erozije te su citotoksične za stanice ispod tog sloja. Vijabilnost stanica mjeri se enzimskom konverzijom vitalne boje MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil plavo tetrazolijev bromid; CAS broj 298-93-1] u sol plavog formazana koja se kvantitativno mjeri nakon ekstrakcije iz tkiva (27.). Nagrizajuće kemikalije prepoznaju se po tome što smanjuju vijabilnost stanica ispod definiranih pragova (vidjeti stavke 35. i 36.). Pokazalo se da se ispitnom metodom za utvrđivanje nagrizanja kože koja se temelji na modelu RhE može predvidjeti nagrizajuće djelovanje na kožu *in vivo* koje je procijenjeno kod kunića u skladu s ispitnom metodom B.4. (2.).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

13. Prije rutinske primjene bilo kojeg od četiriju validiranih ispitnih modela RhE koji su u skladu s ovom ispitnom metodom laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost pravilnim utvrđivanjem kategorije dvanaest tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti koje su navedene u tablici 1. U slučaju upotrebe metode za daljnje razvrstavanje trebalo bi dokazati i pravilno daljnje razvrstavanje. U slučajevima u kojima nije dostupna navedena tvar ili ako je to opravdano, može se upotrijebiti druga tvar za koju su dostupni primjereni referentni *in vivo* i *in vitro* podaci (npr. s popisa referentnih kemikalija (24.)) pod uvjetom da se primjenjuju isti kriteriji za odabir kao oni opisani u tablici 1.

Tablica 1.

Popis tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti ⁽¹⁾

Tvar	CAS br.	Kemijski razred ⁽²⁾	Kat. sustava UN GHS-a ili CLP-a na temelju <i>in vivo</i> rezultata ⁽³⁾	Kat. VRM-a na temelju <i>in vitro</i> rezultata ⁽⁴⁾	Redukcija MTT-a ⁽⁵⁾	Agregatno stanje
Tvari koje djeluju nagrizajuće <i>in vivo</i> iz potkategorije 1.A						
Bromoctena kiselina	79-08-3	Organska kiselina	1.A	(3) 1.A	—	S
Borov trifluorid dihidrat	13319-75-0	Anorganska kiselina	1.A	(3) 1.A	—	L
Fenol	108-95-2	Fenol	1.A	(3) 1.A	—	S
Dikloracetil klorid	79-36-7	Elektrofil	1.A	(3) 1.A	—	L
Kombinacija tvari koje djeluju nagrizajuće <i>in vivo</i> iz potkategorija 1.B i 1.C						
Monohidrat glioksilne kiseline	563-96-2	Organska kiselina	1.B i 1.C	(3) 1.B i 1.C	—	S

Tvar	CAS br.	Kemijski razred ⁽²⁾	Kat. sustava UN GHS-a ili CLP-a na temelju <i>in vivo</i> rezultata ⁽³⁾	Kat. VRM-a na temelju <i>in vitro</i> rezultata ⁽⁴⁾	Redukcija MTT-a ⁽⁵⁾	Agregatno stanje
Tvari koje djeluju nagrizajuće <i>in vivo</i> iz potkategorije 1.A						
Mliječna kiselina	598-82-3	Organska kiselina	1.B i 1.C	(3) 1.B i 1.C	—	L
Etanolamin	141-43-5	Organska baza	1.B	(3) 1.B i 1.C	Y	Viskozno
Klorovodična kiselina (14,4 %)	7647-01-0	Anorganska kiselina	1.B i 1.C	(3) 1.B i 1.C	—	L
Tvari koje ne djeluju nagrizajuće <i>in vivo</i>						
Fenetil bromid	103-63-9	Elektrofil	NC	(3) NC	Y	L
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Organska baza	NC	(3) NC	—	S
4-(metiltio)-benzaldehyd	3446-89-7	Elektrofil	NC	(3) NC	Y	L
Laurinska kiselina	143-07-7	Organska kiselina	NC	(3) NC	—	S

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; VRM = validirana referentna metoda; NC = nije nagrizajuće; Y = da; S = kruto; L = tekuće

⁽¹⁾ Tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti, prvo razvrstane na tvari koje djeluju nagrizajuće i one koje ne djeluju nagrizajuće, zatim prema potkategoriji nagrizanja i potom kemijskom razredu, odabrane su među tvarima koje su upotrijebljene u ECVAM-ovoj validacijskoj studiji modela EpiSkin™ i EpiDerm™ (8., 9. i 10.) te iz postvalidacijskih studija na temelju podataka koje su dostavili subjekti koji su razvili EpiSkin™ (22.), EpiDerm™, SkinEthic™ i epiCS® (23.). Osim ako je drukčije navedeno, tvari su ispitane na razini čistoće koja se dobiva kad se kupe od komercijalnog izvora (8. i 10.). Odabir uključuje, u mjeri u kojoj je to moguće, tvari: i. koje su reprezentativne za raspon nagrizajućih odgovora (npr. tvari koje ne djeluju nagrizajuće, tvari sa slabim do jakim nagrizajućim djelovanjem) koji se mogu izmjeriti ili predvidjeti validiranim referentnim metodama; ii. koje su reprezentativne za kemijske razrede koji su korišteni u validacijskim studijama; iii. koje imaju dobro utvrđene kemijske strukture; iv. koje induciraju ponovljive rezultate u validiranoj referentnoj metodi; v. koje induciraju konačne rezultate u *in vivo* referentnoj ispitnoj metodi; vi. koje su komercijalno dostupne; i vii. koje nisu povezane s neprimjereno visokim troškovima zbrinjavanja.

⁽²⁾ Kemijski razred koji su dodijelili Barratt i dr. (8.).

⁽³⁾ Odgovarajuće ambalažne skupine UN-a I., II. i III. za kategorije 1.A, 1.B odnosno 1.C UN GHS-a ili CLP-a.

⁽⁴⁾ Predviđanja VRM *in vitro* navedena u ovoj tablici dobivena su ispitnim modelima EpiSkin™ i EpiDerm™ (VRM-ovim) tijekom postvalidacijskog ispitivanja koje su obavili subjekti koji su razvili ispitnu metodu.

⁽⁵⁾ Vrijednosti vijabilnosti dobivene ECVAM-ovim validacijskim studijama nagrizanja kože nisu ispravljene za izravnu redukciju MTT-a (u validacijskim studijama nisu provedene usmrćene kontrolne skupine). Međutim, postvalidacijski podaci subjekata koji su razvili ispitnu metodu prikazani u ovoj tablici dobiveni su prilagođenim kontrolama (23.).

14. U okviru dokazivanja osposobljenosti preporučuje se da korisnik po primitku provjeri svojstva barijere tkiva u skladu sa specifikacijama proizvođača modela RhE. To je posebno važno ako se tkiva šalju na velike udaljenosti/tijekom dugih vremenskih razdoblja. Nakon što se metoda uspješno uspostavi i nakon što se dokaže osposobljenost u pogledu njezine uporabe, takva rutinska provjera neće biti potrebna. Međutim, kod rutinske uporabe ispitne metode preporučuje se daljnje ocjenjivanje svojstava barijere u pravilnim vremenskim intervalima.

POSTUPAK

15. U nastavku se nalazi opći opis elemenata i postupaka u vezi s metodom na temelju rekonstruirane ljudske epiderme za potrebe ocjenjivanja nadraživanja kože obuhvaćenih ovom ispitnom metodom. Modeli RhE koji su podržani kao znanstveno valjani za upotrebu u ovoj ispitnoj metodi, tj. modeli EpiSkin™ (standardni model), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE i epiCS® (16., 17., 19., 28., 29., 30., 31., 32. i 33.) mogu se nabaviti iz komercijalnih izvora. Dostupni su standardni operativni postupci za ta četiri modela RhE (34., 35., 36. i 37.), a glavni elementi ispitne metode sažeti su u Dodatku 2. Preporučuje se da se pri provedbi i upotrebi jednog od tih modela u laboratoriju prouči relevantni standardni operativni postupak. Ispitivanje s četiri ispitna modela RhE obuhvaćena ovom ispitnom metodom trebalo bi biti u skladu sa sljedećim:

ELEMENTI ISPITNE METODE RHE

Opći uvjeti

16. Za rekonstruiranje epitela treba koristiti netransformirane ljudske keratinocite. Ispod funkcionalnog rožnatog sloja (*stratum corneum*) nalaze se višestruki slojevi vijabilnih epitelnih stanica (bazalni sloj, trnasti sloj, zrnati sloj). I sam rožnati sloj višeslojan je te sadržava esencijalni profil lipida kao čvrstu funkcionalnu barijeru koja je sposobna zaustaviti brzi prodor citotoksičnih referentnih kemikalija, npr. natrijev dodecil-sulfat (SDS) ili Triton X-100. Funkciju barijere trebalo bi dokazati i može se ocijeniti određivanjem koncentracije pri kojoj referentna kemikalija smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % (IC_{50}) nakon fiksnog vremena izlaganja ili određivanjem vremena izlaganja koje je potrebno da se vijabilnost stanica smanji za 50 % (ET_{50}) nakon primjene referentne kemikalije u unaprijed određenoj fiksnoj koncentraciji (vidjeti stavak 18.). Model RhE mora biti dovoljno nepropustan da spriječi prolazak materijala oko rožnatog sloja do vijabilnog tkiva jer bi to dovelo do lošeg modeliranja izlaganja kože. Model RhE ne smije biti onečišćen bakterijama, virusima, mikoplazmama ili gljivicama.

Funkcionalni uvjeti*Vijabilnost*

17. Za kvantifikaciju vijabilnosti tkiva upotrebljava se MTT test (27.). Vijabilne stanice modela tkiva RhE reduciraju vitalnu boju MTT u talog plavog MTT formazana koji se zatim ekstrahira iz tkiva izopropanolom (ili sličnim otapalom). Optička gustoća (OD) samog ekstrakcijskog otapala treba biti dovoljno mala tj. $OD < 0,1$. Ekstrahirani MTT formazan može se kvantificirati upotrebom mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupkom HPLC/UPLC spektrofotometrije (38.). Korisnici modela RhE trebali bi osigurati da svaka šarža modela RhE koji se upotrebljava ispunjava utvrđene kriterije za negativnu kontrolu. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole trebao bi utvrditi subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač tog modela. Rasponi prihvatljivosti za vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole za četiri validirana ispitna modela RhE uključena u ovu ispitnu metodu navedeni su u tablici 2. Korisnik HPLC/UPLC spektrofotometrije trebao bi upotrebljavati raspone optičke gustoće negativne kontrole navedene u tablici 2. kao kriterij prihvatljivosti za negativnu kontrolu. Potrebno je dokumentirati da su tkiva obrađena negativnom kontrolom stabilna u kulturi (tj. daju slična mjerenja optičke gustoće) za vrijeme trajanja izlaganja.

Tablica 2.

Rasponi prihvatljivosti vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole za kontrolu kvalitete šarži

	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EpiSkin™ (standardna metoda)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Funkcija barijere

18. Rožnati sloj sa svojim sastavom lipida trebao bi biti sposoban zaustaviti brzi prodor određenih citotoksičnih referentnih kemikalija (npr. SDS ili Triton X-100), procijenjeno na temelju IC_{50} ili ET_{50} (tablica 3.). Subjekt koji je razvio model RhE ili njegov prodavatelj trebao bi pri dostavi tkiva krajnjem korisniku dokazati funkciju barijere svake šarže modela RhE koji se upotrebljava (vidjeti stavak 21.).

Morfologija

19. U izvedbi histološkog pregleda modela RhE mora se dokazati da je struktura slična višeslojnoj strukturi ljudske epiderme koja sadržava bazalni sloj, trnasti sloj, zrnati sloj i rožnati sloj te pokazuje profil lipida sličan profilu lipida ljudske epiderme. Subjekt koji je razvio model RhE ili njegov prodavatelj trebao bi pri dostavi tkiva krajnjem korisniku dostaviti histološko ispitivanje svake šarže modela RhE koji se upotrebljava kojim se dokazuje odgovarajuća morfologija tkiva (vidjeti stavak 21.).

Obnovljivost

20. Korisnici ispitnih metoda trebali bi dokazati obnovljivost ispitnih metoda tijekom vremena primjenom pozitivnih i negativnih kontrola. Nadalje, ispitna metoda trebala bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač dostavi podatke kojima se dokazuje obnovljivost tijekom vremena primjenom kemikalija koje djeluju nagrizajuće i onih koje ne djeluju nagrizajuće, npr. s popisa tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti (tablica 1.). U slučaju upotrebe ispitne metode za daljnje razvrstavanje trebalo bi dokazati i obnovljivost u pogledu potkategorija.

Kontrola kvalitete (KK)

21. Model RhE trebao bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji ga je razvio ili dobavljač dokaže da svaka šarža upotrijebljenog modela RhE ispunjava definirane kriterije za odobrenje proizvoda, među kojima su najvažniji oni za *vijabilnost* (stavak 17.), *funkciju barijere* (stavak 18.) i *morfologiju* (stavak 19.). Ti se podaci trebaju dostaviti korisnicima ispitne metode tako da ih mogu uključiti u izvješće o ispitivanju. Za pouzdano predviđanje nagrizajućeg razvrstavanja prihvatljivi su isključivo rezultati dobiveni sa šaržama tkiva koje ispunjavaju kontrolu kvalitete. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za IC50 ili ET50 utvrđuje subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač tog modela. Rasponi prihvatljivosti za četiri validirana ispitna modela navedeni su u tablici 3.

Tablica 3.

Kriteriji za kontrolu kvalitete šarže

	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EpiSkin™ (standardna metoda) (18-satno tretiranje SDS-om) (33.)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34.)	ET50 = 4,0 sati	ET50 = 8,7 sati
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35.)	ET50 = 4,0 sati	ET50 = 10,0 sati
epiCS® (1 % Triton X-100) (36.)	ET50 = 2,0 sati	ET50 = 7,0 sati

Primjena ispitivane kemikalije i kontrolnih kemikalija

22. Za svaku ispitnu kemikaliju i kontrole trebala bi se upotrijebiti barem dva ponovljena tkiva za svako vrijeme izlaganja. I kod tekućina i kemikalija u krutom stanju treba primijeniti dovoljnu količinu ispitivane kemikalije kako bi se ravnomjerno pokrila površina epiderme tako da se izbjegne beskonačna doza, tj. trebalo bi upotrijebiti najmanje 70 µl/cm² ili 30 mg/cm² kemikalije. Ovisno o modelima, površinu epiderme trebalo bi navlažiti deioniziranom ili destiliranom vodom prije primjene kemikalija u krutom stanju kako bi se poboljšao kontakt ispitivane kemikalije s površinom epiderme (34., 35., 36. i 37.). Kad je god moguće, kemikalije u krutom stanju

treba ispitivati u obliku sitnog praha. Metodu primjene treba prilagoditi ispitivanoj kemikaliji (vidjeti npr. upućivanja (34.–37.). Na kraju razdoblja izlaganja ispitivanu kemikaliju treba pažljivo oprati s epiderme vodenom puferском otopinom ili 0,9-postotnom NaCl. Ovisno o tome koji se od četiri validirana ispitna modela RhE upotrebljava, upotrebljavaju se dva ili tri razdoblja izlaganja po ispitivanoj kemikaliji (za sva četiri valjana modela RhE: 3 min. i 1 sat; za EpiSkin™ dodatno vrijeme izlaganja od četiri sata). Ovisno o tome koji se ispitni model RhE upotrebljava i razdoblju izlaganja koje se procjenjuje, temperatura inkubacije tijekom izlaganja može varirati od sobne temperature do 37 °C.

23. U svakom bi se ciklusu trebale upotrebljavati istodobne negativne i pozitivne kontrole kako bi se dokazalo da su vijabilnost (s negativnim kontrolama), funkcija barijere i posljedična osjetljivost tkiva (s pozitivnim kontrolama) unutar prihvatljivog raspona utvrđenog na temelju rezultata prijašnjih ispitivanja. Kao kemikalija pozitivne kontrole predlaže se ledena octena kiselina ili 8N KOH, ovisno o modelu RhE koji se upotrebljava. Trebalo bi napomenuti da 8N KOH izravno reducira MTT pa će možda biti potrebne prilagođene kontrole kako je opisano u stavcima 25. i 26. Kao negativna kontrolna tvar predlaže se 0,9-postotna NaCl (w/v) ili voda.

Mjerenja vijabilnosti stanica

24. MTT test je kvantitativni test koji bi se trebao upotrebljavati za mjerenje vijabilnosti stanica na temelju ove ispitne metode (27.). Uzorak tkiva stavlja se u otopinu MTT odgovarajuće koncentracije (0,3 ili 1 mg/ml) i ostavi u njoj tri sata. Nataloženi plavi formazan zatim se ekstrahira iz tkiva s pomoću otapala (npr. izopropanol, kiseli izopropanol) i koncentracija formazana mjeri se određivanjem vrijednosti OD na 570 nm uz pojas propuštanja do najviše ± 30 nm ili postupkom HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavke 30. i 31.) (38.).
25. Ispitivane kemikalije mogu ometati MTT test izravnom redukcijom MTT-a u plavi formazan i/ili interferencijom s bojom ako ispitivana kemikalija apsorbira, prirodno ili zbog postupaka tretiranja, u istom rasponu optičke gustoće formazana (570 ± 30 nm, uglavnom plave i ljubičaste kemikalije). Treba upotrijebiti dodatne kontrole kako bi se utvrdila i ispravila moguća interferencija do koje dovode te ispitivane kemikalije, kao što su kontrola nespecifične redukcije MTT-a (NSMTT) i kontrola nespecifične boje (NSC) (vidjeti stavke od 26. do 30.). To je osobito važno kada se određena ispitivana kemikalija ne ispere u potpunosti s tkiva ili prodre u epidermu te je stoga prisutna u tkivima pri provođenju MTT testa vijabilnosti. Podroban opis načina na koji se ispravljaju izravna redukcija MTT-a i interferencija bojila dostupan je u standardnim operativnim postupcima za ispitne modele (34., 35., 36. i 37.).
26. Kako bi se identificirale tvari koje izravno reduciraju MTT, svaku bi ispitivanu kemikaliju trebalo dodati u svježe pripremljeni medij MTT (34., 35., 36. i 37.). Ako smjesa MTT-a koja sadržava ispitivanu kemikaliju postane plava/ljubičasta, pretpostavlja se da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT i treba se provesti daljnja funkcionalna provjera nevijabilne epiderme, neovisno o upotrebi mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije. U toj dodatnoj funkcionalnoj provjeri upotrebljavaju se mrtva tkiva kod kojih je prisutna samo preostala metabolička aktivnost, ali koja apsorbiraju sličnu količinu ispitivane kemikalije kao vijabilna tkiva. Svaka kemikalija koja reducira MTT primjenjuje se na barem dva ponovljena mrtva tkiva po vremenu izlaganja, koja se podvrgavaju cijelom ispitivanju nagrizanja kože. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih tvari koja reducira MTT umanjenom za postotak nespecifične redukcije MTT-a dobivene s mrtvim tkivima izloženima istoj tvari koja reducira MTT, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSMTT).
27. Kako bi se identificirala potencijalna interferencija obojenih ispitivanih kemikalija ili ispitivanih kemikalija koje se oboje u dodiru s vodom ili izopropanolom te kako bi se odlučilo jesu li potrebne dodatne kontrole, trebalo bi provesti spektralnu analizu ispitivane kemikalije u vodi (okoliš tijekom izlaganja) i/ili izopropanolu (otopina za ekstrakciju). Ako ispitivana kemikalija u vodi i/ili izopropanolu apsorbira svjetlost u rasponu od 570 ± 30 nm, trebalo bi provesti daljnje kontrole bojila ili bi, kao alternativu, trebalo primijeniti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije; u potonjem slučaju te kontrole nisu potrebne (vidjeti stavke 30. i 31.). Pri provedbi mjerenja standardne apsorbancije (OD) svaka interferirajuća obojena ispitivana kemikalija primjenjuje

se na najmanje dva ponovljena uzorka vijabilnog tkiva po vremenu izlaganja, koji se podvrgavaju cijelom ispitivanju nagrizanja kože, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne otopinom MTT-a, kako bi nastala kontrola nespecifične boje (NSC_{living}). Kontrolu NSC_{living} treba provoditi istodobno po vremenu izlaganja po obojenoj ispitivanoj kemikaliji (u svakom ciklusu) zbog svojstvene biološke varijabilnosti živih tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranih otopinom MTT-a, umanjeno za postotak nespecifične boje dobiven sa živim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranim medijem bez MTT-a, što se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSC_{living}).

28. Za ispitivane kemikalije za koje se utvrdi da uzrokuju i izravnu redukciju MTT-a (vidjeti stavak 26.) i interferenciju s bojom (vidjeti stavak 27.) pri mjerenju standardne apsorbancije (OD) bit će potreban i treći skup kontrola, uz kontrole NSMTT i NSC_{living} opisane u prethodnim stavcima. To je obično slučaj kod tamno obojenih ispitivanih kemikalija koje ometaju MTT test (npr. plave, ljubičaste ili crne kemikalije) jer njihova intrinzična boja sprečava procjenu njihove sposobnosti da izravno reduciraju MTT, kako je opisano u stavku 26. Te se ispitivane kemikalije mogu vezati i na živa i na mrtva tkiva te se stoga kontrolom NSMTT može ispraviti ne samo potencijalna izravna redukcija MTT-a ispitivanom kemikalijom, već i interferencija s bojom koja je posljedica vezanja ispitivane kemikalije na mrtva tkiva. To bi moglo dovesti do dvostrukog ispravka za interferenciju s bojom jer se kontrolom NSC_{living} već ispravlja interferencija s bojom koja je posljedica vezanja ispitivane kemikalije na živa tkiva. Kako bi se izbjegao mogući dvostruki ispravak za interferenciju s bojom, treba provesti treću kontrolu za nespecifičnu boju u mrtvim tkivima (NSC_{killed}). U toj dodatnoj kontroli ispitivana kemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva po vremenu izlaganja, koja se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne otopinom MTT-a. Dovoljna je jedna kontrola NSC_{killed} po ispitivanoj kemikaliji neovisno o broju provedenih neovisnih ispitivanja/ciklusa, ali treba je provoditi istodobno s kontrolom NSMTT i, ako je moguće, s istom šaržom tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih ispitivanoj kemikaliji umanjeno za %NSMTT i %NSC_{living} te uvećano za postotak nespecifične boje dobiven s mrtvim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranim medijem bez MTT-a, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSC_{killed}).
29. Važno je napomenuti da nespecifična redukcija MTT-a i nespecifična interferencija s bojom mogu povećati očitavanja ekstrakta tkiva izvan raspona linearnosti spektrofotometra. Na temelju toga svaki bi laboratorij prije početka ispitivanja ispitivanih kemikalija u regulatorne svrhe trebao utvrditi raspon linearnosti svojeg spektrofotometra s MTT formazanom (CAS # 57360-69-7) iz komercijalnog izvora. Točnije, mjerenje standardne apsorbancije (OD) upotrebom spektrofotometra primjereno je za procjenu tvari koje izravno reduciraju MTT i ispitivanih kemikalija koje interferiraju s bojom ako je optička gustoća ekstrakata tkiva dobivena ispitivanom kemikalijom bez ikakvih ispravaka za izravnu redukciju MTT-a i/ili interferenciju s bojom unutar linearnog raspona spektrofotometra ili ako je neispravljenim postotkom vijabilnosti dobivenim ispitivanom kemikalijom ona već utvrđena kao nagrizajuća (vidjeti stavke 35. i 36.). Ipak, rezultate za ispitivane kemikalije koji daju %NSMTT i/ili %NSC_{living} > 50 % negativne kontrole trebalo bi oprezno tumačiti.
30. Kod obojenih ispitivanih kemikalija koje nisu kompatibilne s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) zbog prejake interferencije s MTT testom, za mjerenje MTT formazana može se upotrijebiti alternativni postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavak 31.) (37.). Sustav HPLC/UPLC spektrofotometrije omogućuje izdvajanje MTT formazana iz ispitivane kemikalije prije njegove kvantifikacije (38.). Zato pri upotrebi HPLC/UPLC spektrofotometrije nikad nisu potrebne kontrole NSC_{living} ili NSC_{killed}, neovisno o kemikaliji koja se ispituje. Kontrole NSMTT ipak bi se trebale upotrijebiti ako se sumnja u to da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT ili ima boju koja sprečava procjenu sposobnosti izravne redukcije MTT-a (kako je opisano u stavku 26.). Ako se za mjerenje MTT formazana upotrebljava HPLC/UPLC spektrofotometrija, postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobiven s istodobnom negativnom kontrolom. Za ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati MTT prava vijabilnost tkiva računa se kao postotak vijabilnosti tkiva dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji umanjeno za %NSMTT. Naposljetku, treba

napomenuti da se ne mogu procijeniti tvari koje izravno reduciraju MTT i koje ujedno mogu i interferirati s bojom, koje se zadržavaju u tkivima nakon tretiranja i reduciraju MTT toliko jako da dovode do optičke gustoće (upotrebom standardnog mjerenja optičke gustoće) ili površina pika (upotrebom UPLC/HPLC spektrofotometrije) ispitivanih ekstrakata tkiva koji su izvan raspona linearnosti spektrofotometra, iako do toga dolazi samo u iznimno rijetkim slučajevima.

31. HPLC/UPLC spektrofotometrija može se upotrebljavati i sa svim vrstama ispitivanih kemikalija (obojenima, neobojenima, koje reduciraju MTT i koje ga ne reduciraju) za mjerenje MTT formazana (38.). Zbog raznolikosti sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije, kvalifikaciju sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije trebalo bi dokazati prije njegove upotrebe za kvantificiranje MTT formazana iz ekstrakata tkiva tako da sustav ispuni kriterije prihvatljivosti za skup standardnih parametara kvalifikacije u skladu s parametrima opisanima u smjernicama američke Uprave za hranu i lijekove o validaciji bioanalitičkih metoda namijenjenih industriji (38. i 39.). Ti ključni parametri i njihovi kriteriji prihvatljivosti prikazani su u Dodatku 4. Kad se ispune kriteriji prihvatljivosti definirani u Dodatku 4., smatra se da je sustav HPLC/UPLC spektrofotometrije kvalificiran i spreman za mjerenje MTT formazana u pokusnim uvjetima opisanima u ovoj ispitnoj metodi.

Kriteriji prihvatljivosti

32. Za svaku ispitnu metodu u kojoj se upotrebljavaju valjani modeli RhE, tkiva tretirana negativnom kontrolom trebala bi pokazivati optičku gustoću koja odražava kvalitetu tkiva, kako je opisano u tablici 2., i ne bi trebala biti ispod prethodno utvrđenih granica. Tkiva tretirana pozitivnom kontrolom, tj. ledenom octenom kiselinom ili 8N KOH, trebala bi odražavati sposobnost tkiva da odgovore na nagrizajuću kemikaliju u uvjetima ispitnog modela (vidjeti Dodatak 2.). Varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva ispitivane kemikalije i/ili kontrolnih kemikalija trebala bi biti unutar prihvaćenih ograničenja za svaki zahtjev valjanog modela RhE (vidjeti Dodatak 2.) (npr. razlika u vijabilnosti između sva ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 30 %). Ako negativna ili pozitivna kontrola uključena u ciklus bude izvan prihvaćenih raspona, smatra se da ciklus ne ispunjava zahtjeve i treba ga ponoviti. Ako je varijabilnost ispitivanih kemikalija izvan definiranih raspona, trebalo bi ponoviti ispitivanje.

Tumačenje rezultata i model predviđanja

33. Vrijednosti optičke gustoće za svaku ispitivanu kemikaliju trebalo bi koristiti za izračun postotka vijabilnosti u odnosu na negativnu kontrolu, koja je određena kao 100 %. U slučaju upotrebe HPLC/UPLC spektrofotometrije postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobiven s istodobnom negativnom kontrolom. Granične vrijednosti vijabilnosti stanica, izražene postotkom, koje služe za razlikovanje nagrizajućih od nenagrizajućih ispitivanih kemikalija (ili za razlikovanje različitih potkategorija nagrizajućeg djelovanja) navedene su u nastavku u stavcima 35. i 36. za svaki ispitni model obuhvaćen ovom ispitnom metodom i trebale bi se upotrebljavati za tumačenje rezultata.
34. Jedan ciklus ispitivanja koji obuhvaća najmanje dva ponovljena uzorka tkiva trebao bi biti dovoljan za ispitivanu kemikaliju ako je dobiveno razvrstavanje nedvosmisleno. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja, može se razmotriti drugi ciklus, a i treći ciklus u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva ciklusa.

35. Model predviđanja za ispitni model EpiSkin™ za ispitivanje nagrizanja kože (9., 34. i 22.), povezan sa sustavom razvrstavanja UN GHS-om ili CLP-om, prikazan je u tablici 4.

Tablica 4.

Model predviđanja za EpiSkin™

Vijabilnost mjerena u točkama vremena izlaganja (t = 3, 60 i 240 minuta)	Predviđanje koje treba razmotriti
< 35 % nakon 3 min. izlaganja	Nagrizajuće: • Neobavezna potkategorija 1.A (*)
≥ 35 % nakon 3 min. izlaganja I < 35 % nakon 60 min. izlaganja III ≥ 35 % nakon 60 min. izlaganja I < 35 % nakon 240 minuta izlaganja	Nagrizajuće: • Kombinacija neobaveznih potkategorija 1.B i 1.C
≥ 35 % nakon 240 min. izlaganja	Nije nagrizajuće

(*) Prema podacima koji su generirani kako bi se procijenila korisnost ispitnih modela RhE za potporu daljnjem razvrstavanju, pokazalo se da približno 22 % rezultata u potkategoriji 1.A dobivenih ispitnim modelom EpiSkin™ možda zapravo čine tvari/smjese iz potkategorije 1.B ili 1.C (prestrogo razvrstavanje) (vidjeti Dodatak 3.).

36. Modeli predviđanja za ispitne modele EpiDerm™ SCT (10., 23. i 35.), SkinEthic™ RHE (17., 18., 23. i 36.) i epiCS® (16., 23. i 37.) za ispitivanje nagrizanja kože povezani sa sustavom razvrstavanja UN GHS-om ili CLP-om prikazani su u tablici 5.:

Tablica 5.

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE i epiCS®

Vijabilnost mjerena u točkama vremena izlaganja (t = 3 i 60 minuta)	Predviđanje koje treba razmotriti
KORAK 1 za EpiDerm™ SCT, za SkinEthic™ RHE i epiCS®	
< 50 % nakon 3 min. izlaganja	Nagrizajuće
≥ 50 % nakon 3 min. izlaganja I < 15 % nakon 60 min. izlaganja	Nagrizajuće
≥ 50 % nakon 3 min. izlaganja I ≥ 15 % nakon 60 min. izlaganja	Nije nagrizajuće
KORAK 2 za EpiDerm™ SCT – za tvari/smjese identificirane kao nagrizajuće u koraku 1	
< 25 % nakon 3 min. izlaganja	Neobavezna potkategorija 1.A*

Vijabilnost mjerena u točkama vremena izlaganja (t = 3 i 60 minuta)	Predviđanje koje treba razmotriti
KORAK 1 za EpiDerm™ SCT, za SkinEthic™ RHE i epiCS®	
≥ 25 % nakon 3 min. izlaganja	Kombinacija neobaveznih potkategorija 1.B i 1.C
KORAK 2 za SkinEthic™ RHE – za tvari/smjese identificirane kao nagrizajuće u koraku 1	
< 18 % nakon 3 min. izlaganja	Neobavezna potkategorija 1.A*
≥ 18 % nakon 3 min. izlaganja	Kombinacija neobaveznih potkategorija 1.B i 1.C
KORAK 2 za epiCS® – za tvari/smjese identificirane kao nagrizajuće u koraku 1	
< 15 % nakon 3 min. izlaganja	Neobavezna potkategorija 1.A*
≥ 15 % nakon 3 min. izlaganja	Kombinacija neobaveznih potkategorija 1.B i 1.C

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

37. Podatke pojedinačnih ponavljanja uzoraka tkiva u svakom ispitivanju (npr. vrijednosti OD i izračunani postotak vijabilnosti stanica za svaku ispitivanu kemikaliju, zajedno s razvrstavanjem) treba prikazati u tabličnom obliku, uključujući eventualne podatke iz ponovljenih pokusa. Osim toga, treba navesti srednje vrijednosti i raspone vijabilnosti te koeficijente varijacije između ponovljenih uzoraka tkiva za svako ispitivanje. Za svaku ispitivanu kemikaliju treba navesti zapažene interakcije tvari koje reduciraju MTT ili obojenih ispitivanih kemikalija s MTT reagensom.

Izvjeshće o ispitivanju

38. Izvjeshće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija i kontrolne kemikalije:

- tvar s jednim sastojkom: kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa: opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka,
- fizički izgled, topljivost u vodi i bilo koja druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- izvor, broj serije, ako su dostupni,
- tretiranje ispitivanih kemikalija/kontrolne tvari prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),
- stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,

— uvjeti skladištenja.

Model RhE i protokol koji se upotrebljavaju te obrazloženje odabira (ako je primjenjivo)

Ispitni uvjeti:

- model RhE koji se upotrebljava (uključujući broj šarže),
- informacije o kalibraciji mjernog uređaja (npr. spektrofotometar), valna duljina i pojas propuštanja (ako je primjenjivo) koji se upotrebljavaju za kvantifikaciju MTT formazana te raspon linearnosti mjernog uređaja,
- opis metode koja se upotrebljava za kvantifikaciju MTT formazana,
- opis kvalifikacije sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije, ako je primjenjivo,
- potpune popratne informacije o konkretnom upotrijebljenom modelu RhE, uključujući njegove radne značajke. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:
 - i) vijabilnost;
 - ii) funkciju barijere;
 - iii) morfologiju;
 - iv) obnovljivost i prediktivnu sposobnost;
 - v) kontrole kvalitete modela,
- upućivanje na prijašnje podatke za predmetni model. To bi, među ostalim, trebalo uključivati prihvatljivost podataka o kontroli kvalitete s upućivanjem na prijašnje podatke o šarži,
- dokazivanje osposobljenosti za izvođenje ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti.

Ispitni postupak:

- pojedinosti o upotrijebljenom ispitnom postupku (uključujući postupke ispiranja upotrijebljene nakon razdoblja izlaganja),
- doze upotrijebljenih ispitivanih kemikalija i kontrolnih kemikalija,
- trajanje razdoblja izlaganja i temperature izlaganja,
- oznake kontrola koje se koriste za tvari koje izravno reduciraju MTT i/ili ispitivane kemikalije za bojenje, ako je primjenjivo,

- broj ponavljanja uzoraka tkiva upotrijebljenih po ispitivanoj kemikaliji i kontrolama (pozitivna kontrola, negativna kontrola te NSMTT, NSCliving i NSCKilled, ako je primjenjivo) po vremenu izlaganja,
- opis primijenjenih kriterija za odlučivanje/modela predviđanja na temelju upotrijebljenog RhE modela,
- opis mogućih izmjena ispitne metode (uključujući postupke ispiranja).

Kriteriji prihvatljivosti ciklusa i ispitivanja:

- srednje vrijednosti i rasponi prihvatljivosti pozitivnih i negativnih kontrola na temelju prijašnjih podataka,
- prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za pozitivne i negativne kontrole,
- prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za ispitivanu kemikaliju.

Rezultati:

- tablični prikaz podataka za pojedinačne ispitivane kemikalije i kontrole, za svako razdoblje izlaganja, svaki ciklus i svako ponovljeno mjerenje, uključujući optičku gustoću ili površinu pika MTT formazana, postotak vijabilnosti tkiva, srednji postotak vijabilnosti tkiva, razlike između ponovljenih uzoraka, standardne devijacije i/ili koeficijente varijacije, ako je primjenjivo,
- ako je primjenjivo, rezultati kontrola upotrijebljenih za tvari koje izravno reduciraju MTT i/ili ispitivane kemikalije za bojenje, uključujući optičku gustoću ili površinu pika MTT formazana, %NSMTT, %NSCliving, %NSCKilled, razlike između ponovljenih uzoraka tkiva, standardne devijacije i/ili koeficijente varijacije (ako je primjenjivo) te konačni točni postotak vijabilnosti tkiva,
- rezultati dobiveni s ispitivanom kemikalijom/kemikalijama i kontrolnim kemikalijama u odnosu na utvrđene kriterije prihvatljivosti za ciklus i ispitivanje,
- opis drugih uočenih učinaka,
- utvrđeno razvrstavanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterije odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

1. UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York i Ženeva. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
2. Poglavlje B.4. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje kože.
3. Poglavlje B.40. ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*.

4. Poglavlje B.65. ovog Priloga, *In vitro* ispitna metoda s membranskom barijerom.
5. Poglavlje B.46. ovog Priloga, Nadraživanje kože *in vitro*: ispitna metoda na modelu rekonstruirane ljudske epiderme.
6. OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
7. Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23:219.–255.
8. Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxicol.In Vitro* 12:471.–482.
9. Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol.in Vitro* 12:483.–524.
10. Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzthütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371.–401.
11. Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, *ATLA* 23:129.–147.
12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, SAD.
13. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPIKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, SAD.
14. EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3. travnja 1998.
15. EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21. ožujka 2000.
16. Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In Vitro* 19: 925.–929.

17. Kandárová H., Liebsch M., Spielmann, H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N., Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol. In Vitro* 20: 547.–559.
18. Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm² Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379.–1385.
19. EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 studenoga 2006.
20. EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12. lipnja 2009.
21. OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
22. Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131.–145.
23. Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055.–2080.
24. OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
25. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
26. Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62:393.–403.
27. Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55.–63.
28. Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. U: *In Vitro Skin Toxicology*. Rougier A., Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133.–140.
29. Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol. in Vitro* 8:889.–891.
30. Ponc M., Boelsma E., Weerheim A., Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. *Inter. J. Pharmaceu.* 203:211.–225.

31. Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310.-319.
32. Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163.-171.
33. Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747.-756.
34. EpiSkin™ SOP (December 2011). INVITTOX Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.
35. EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.
36. SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). INVITTOX Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.
37. EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.
38. Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol.In Vitro* 29: 741.-761.
39. US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (svibanj 2001.). Dostupno na: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (25.).

Vijabilnost stanica: parametar za mjerenje ukupne aktivnosti populacije stanica, npr. sposobnost staničnih mitohondrijskih dehidrogenaza da reduciraju vitalnu boju MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil plavo), koji, ovisno o krajnjoj točki koja se mjeri i planu ispitivanja, korelira s ukupnim brojem i/ili vitalnošću živih stanica.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Podudarnost: mjerilo učinkovitosti ispitne metode za ispitne metode koje daju kategorijski rezultat i jedan je od aspekata relevantnosti. Pojam je ponekad međusobno zamjenjiv s pojmom točnosti i definira se kao udio svih ispitanih kemikalija koje su pravilno razvrstane kao pozitivne ili negativne. Podudarnost u velikoj mjeri ovisi o prisutnosti pozitivnih rezultata u vrstama ispitivane kemikalije (25.).

ET₅₀: može se procijeniti utvrđivanjem vremena izlaganja potrebnog za smanjenje vijabilnosti stanica za 50 % nakon primjene referentne kemikalije u određenoj, fiksnoj koncentraciji; vidjeti i IC₅₀.

GHS (Globalno usklađeni sustav razvrstavanja i označivanja kemikalija): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti te opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (1.).

HPLC: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

IATA: integrirani pristup ispitivanju i procjeni.

IC₅₀: može se procijeniti utvrđivanjem koncentracije pri kojoj referentna kemikalija smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % (IC₅₀) nakon fiksnog vremena izlaganja; vidjeti i ET₅₀.

Beskonačna doza: količina ispitivane kemikalije primijenjena na epidermu koja je veća od količine potrebne da bi se potpuno i ravnomjerno pokrila površina epiderme.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari koje u njoj ne reagiraju.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil plavo tetrazolijev bromid.

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji većoj od 10 % (w/w) te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

NC: nije nagrizajuće.

Kontrola NSC_{killed}: kontrola nespecifične boje u mrtvim tkivima.

Kontrola NSC_{living}: kontrola nespecifične boje u živim tkivima.

NSMTT: nespecifična redukcija MTT-a.

OD: optička gustoća.

PC: pozitivna kontrola; ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je kemikalijom za koju je poznato da inducira pozitivan odgovor. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Zahtjevi izvedbe (PS): zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Uključuju: i. ključne elemente ispitne metode; ii. minimalni popis referentnih kemikalija odabranih među kemikalijama koje se upotrebljavaju za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode; te iii. slične razine pouzdanosti i točnosti, utemeljene na rezultatima dobivenim za validiranu ispitnu metodu, koje se prilikom ocjenjivanja trebaju dokazati predloženom ispitnom metodom koristeći minimalni popis referentnih kemikalija (25.).

Relevantnost: opis odnosa između ispitne metode i istraživanog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitnom metodom točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitne metode (25.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija (25.).

Ciklus: ciklus se sastoji od jedne ispitivane kemikalije ili više njih, koje se ispituju istodobno s negativnom i pozitivnom kontrolom.

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (25.).

Nagrizanje kože in vivo: uzrokovanje ireverzibilnog oštećenja kože, točnije, vidljive nekroze koja kroz epidermu prodire u dermu nakon što je ispitivana kemikalija primjenjivana u trajanju do najviše četiri sata. Za nagrizanje kože tipična je pojava čireva, krvarenja, krvavih krasta te, do kraja opažanja od 14 dana, gubitak boje kože zbog nestajanja pigmenta, cijele površine zahvaćene alopecijom (gubitak dlake) i ožiljci. Za ocjenjivanje sumnjivih lezija treba razmotriti mogućnost histopatoloških pretraga.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (25.).

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnome stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

UPLC: tekućinska kromatografija iznimno visoke djelotvornosti.

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Dodatak 2.

GLAVNI ELEMENTI ISPITNIH MODELA RHE KOJI SU VALIDIRANI ZA ISPITIVANJE NAGRIZANJA KOŽE

Elementi ispitnog modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Površina modela	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²
Broj ponavljanja uzoraka tkiva	Najmanje dva po vremenu izlaganja	2–3 po vremenu izlaganja	Najmanje dva po vremenu izlaganja	Najmanje dva po vremenu izlaganja
Doze za tretiranje i primjena	<u>Tekućine i viskozne kemikalije:</u> 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm²) <u>Krute tvari:</u> 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ± 5 µl otopine NaCl (9 g/l) <u>Voskovi/ljepljive tvari:</u> 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) s najlonskom mrežom	<u>Tekućine:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²) s najlonskom mrežom ili bez nje <u>Kompatibilnost ispitivane kemikalije s najlonskom mrežom prije ispitivanja</u> <u>Polukrute tvari:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²) <u>Krute tvari:</u> 25 µl H₂O (ili po potrebi više) + 25 mg (39,7 mg/cm²) <u>Voskovi:</u> ravni komad nalik disku promjera otprilike 8 mm koji se stavlja na tkivo navlaženo s 15 µl H₂O.	<u>Tekućine i viskozne kemikalije:</u> 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm²) s najlonskom mrežom <u>Kompatibilnost ispitivane kemikalije s najlonskom mrežom prije ispitivanja</u> <u>Krute tvari:</u> 20 µl ± 2 µl H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) <u>Voskovi/ljepljive tvari:</u> 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) s najlonskom mrežom	<u>Tekućine:</u> 50 µl (83,3 µl/cm²) s najlonskom mrežom <u>Kompatibilnost ispitivane kemikalije s najlonskom mrežom prije ispitivanja</u> <u>Polukrute tvari:</u> 50 µl (83,3 µl/cm²) <u>Krute tvari:</u> 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H₂O (ili po potrebi više) <u>Voskovi:</u> ravni komad nalik kolačiću promjera otprilike 8 mm koji se stavlja na tkivo navlaženo s 15 µl H₂O

Elementi ispitnog modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Prethodna provjera izravne redukcije MTT-a	50 µl (tekućine) ili 20 mg (krute tvari)+ 2 ml MTT 0,3 mg/ml otopine za 180 ± 5 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem vodom	50 µl (tekućine) ili 25 mg (krute tvari)+ 1 ml MTT 1 mg/ml otopine za 60 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem	40 µl (tekućine) ili 20 mg (krute tvari)+ 1 ml MTT 1 mg/ml otopine za 180 ± 15 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem	50 µl (tekućine) ili 25 mg (krute tvari)+ 1 ml MTT 1 mg/ml otopine za 60 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem
Prethodna provjera za interferenciju s bojom	10 µl (tekućine) ili 10 mg (krute tvari) + 90 µl H ₂ O miješano 15 min na sobnoj temperaturi → ako otopina postane obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	50 µl (tekućine) ili 25 mg (krute tvari) + 300 µl H ₂ O za 60 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	40 µl (tekućine) ili 20 mg (krute tvari) + 300 µl H ₂ O miješano 60 min na sobnoj temperaturi → ako je ispitivana kemikalija obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	50 µl (tekućine) ili 25 mg (krute tvari) + 300 µl H ₂ O za 60 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 % → ako otopina postane obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu
Vrijeme i temperatura izloženosti	3 min, 60 min (± 5 min) i 240 min (± 10 min) U ventiliranim ormarima Sobna temperatura (18–28 °C)	3 min na sobnoj temperaturi i 60 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 %	3 min na sobnoj temperaturi i 60 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 %	3 min na sobnoj temperaturi i 60 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 %
Ispiranje	25 ml 1 x PBS (2 ml/odbacivanje)	20 puta uz stalan lagani tok 1 x PBS-a	20 puta uz stalan lagani tok 1 x PBS-a	20 puta uz stalan lagani tok 1 x PBS-a

Elementi ispitnog modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	ePiCS®
Negativna kontrola	50 µl otopine NaCl (9 g/l) Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja	50 µl H ₂ O Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja	40 µl H ₂ O Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja	50 µl H ₂ O Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja
Pozitivna kontrola	50 µl ledene octene kiseline Ispituje se samo četiri sata	50 µl 8N KOH Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja	40 µl 8N KOH Ispituje se samo 1 sat	50 µl 8N KOH Ispituje se sa svakim vremenom izlaganja
Otopina MTT-a	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Vrijeme i temperatura inkubacije MTT-a	180 min (± 15 min) na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 %	180 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 %	180 min (±15 min) na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 %	180 min na 37 °C, 5 % CO ₂ , relativna vlažnost od 95 %
Ekstrakcijsko otapalo	500 µl zakiseljenog izopropanola (0,04 N HCl u izopropanolu) (potpuno urojneno izolirano tkivo)	2 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)	2 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)
Vrijeme i temperatura ekstrakcije	Preko noći na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetla	Preko noći bez protresanja na sobnoj temperaturi ili 120 min uz protresanje (~ 120 rpm) na sobnoj temperaturi	Preko noći bez protresanja na sobnoj temperaturi ili 120 min uz protresanje (~ 120 rpm) na sobnoj temperaturi	Preko noći bez protresanja na sobnoj temperaturi ili 120 min uz protresanje (~ 120 rpm) na sobnoj temperaturi

Elementi ispitnog modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	ePiCS®
Očitavanje optičke gustoće	570 nm (545–595 nm) bez referentnog filtra	570 nm (ili 540 nm) bez referentnog filtra	570 nm (540–600 nm) bez referentnog filtra	540–570 nm bez referentnog filtra
Kontrola kvalitete tkiva	18-satno tretiranje SDS-om 1,0 mg/ml $\leq$ IC ₅₀ $\leq$ 3,0 mg/ml	Tretiranje s 1 % Triton X-100 4,08 sati $\leq$ ET ₅₀ $\leq$ 8,7 sati	Tretiranje s 1 % Triton X-100 4,0 sati $\leq$ ET ₅₀ $\leq$ 10,0 sati	Tretiranje s 1 % Triton X-100 2,0 sati $\leq$ ET ₅₀ $\leq$ 7,0 sati
Kriteriji prihvatljivosti	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (NaCl) trebala bi biti $\geq 0,6$ i $\leq 1,5$ za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (ledena otcena kiselina) na četiri sata, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti ≤ 20 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % i za optičku gustoću $\geq 0,3$, razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 30 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (H₂O) trebala bi biti $\geq 0,8$ i $\leq 2,8$ za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (8N KOH) na 1 sat, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 15 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % koeficijent varijacije između ponovljenih uzoraka tkiva trebao bi biti ≤ 30 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (H₂O) trebala bi biti $\geq 0,8$ i $\leq 2,8$ za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (8N KOH) na 1 sat, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 20 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % i za optičku gustoću $\geq 0,3$, razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 30 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom (H₂O) trebala bi biti $\geq 0,8$ i $\leq 2,8$ za svako vrijeme izlaganja. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli (8N KOH) na 1 sat, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 20 %. 3. U rasponu vijabilnosti 20–100 % i za optičku gustoću $\geq 0,3$, razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 30 %.

Dodatak 3.

UČINKOVITOST ISPITNIH MODELA ZA DALJNJE RAZVRSTAVANJE

U tablici u nastavku navedena je učinkovitost četiriju ispitnih modela izračunana na temelju skupa od 80 kemikalija koje su ispitala četiri subjekta koja su razvila testove. Izračune je provelo tajništvo OECD-a, a pregledala ih je i potvrdila stručna podskupina (21. i 23.).

Ispitnim modelima EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ i epiCS® mogu se odrediti daljnje potkategorije (tj. 1.A naspram 1.B i 1.C naspram NC).

Učinkovitost, stope prestrogog i preblagog razvrstavanja te točnost (prediktivna sposobnost) četiriju ispitnih modela na temelju skupa od 80 kemikalija koje su ispitane u dva ili tri ciklusa u svakom ispitnom modelu:

STATISTIČKI PODACI O PREDVIĐANJIMA DOBIVENI NA CIJELOM SKUPU KEMIKALIJA				
(n = 80 kemikalija ispitivanih u dva neovisna ciklusa za epiCS® ili tri neovisna ciklusa za EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ i SkinEthic™ RHE, tj. 159 (*) odnosno 240 razvrstavanja)				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Prestroga razvrstavanja:				
1.B i 1.C prestrogo razvrstani kao 1.A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NC prestrogo razvrstan kao 1.B i 1.C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NC prestrogo razvrstan kao 1.A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Ispr. prestrogog razvrstavanja	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Opća stopa prestrogog razvrstavanja (sve kategorije)	17,9 %	23,3 %	24,5 %	25,8 %
Preblaga razvrstavanja:				
1.A preblago razvrstan kao 1.B i 1.C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1.A preblago razvrstan kao NC	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1.B i 1.C preblago razvrstani kao NC	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Opća stopa preblagog razvrstavanja (sve kategorije)	3,3 %	2,5 %	5,4 %	4,4 %
Točna razvrstavanja:				
1.A točno razvrstan	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1.B i 1.C točno razvrstani	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
NC točno razvrstan	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Ukupna točnost	78,8 %	74,2 %	70 %	69,8 %

NC: nije nagrizajuće

(*) jedna je kemikalija metodom epiCS® ispitana jednom zbog nedostupnosti (23.)

Dodatak 4.

Ključni parametri i kriteriji prihvatljivosti za kvalifikaciju sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije za mjerenje MTT formazana ekstrahiranog iz tkiva RhE

Parametar	Protokol izveden iz smjernica Uprave za hranu i lijekove (FDA) (37. i 38.)	Kriteriji prihvatljivosti
Selektivnost	Analiza izopropanola, slijepe probe na živom tkivu (ekstrakt izopropanola iz živih tkiva RhE bez ikakvog tretiranja), slijepe probe na mrtvom tkivu (ekstrakt izopropanola iz mrtvih tkiva RhE bez ikakvog tretiranja)	$Površina_{interference} \leq 20 \% površine_{LLOQ}^{(1)}$
Preciznost	Kontrole kvalitete (tj. MTT formazan pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml i 160 µg/ml) u izopropanolu (n = 5)	$CV \leq 15 \% \text{ ili } \leq 20 \% \text{ za LLOQ}$
Točnost	Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	$\%Dev \leq 15 \% \text{ ili } \leq 20 \% \text{ za LLOQ}$
Učinak matrice	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 5)	$85 \% \leq \text{učinak matrice kao } \% \leq 115 \%$
Prijenos	Analiza izopropanola nakon standardnog ULOQ ⁽²⁾	$Površina_{interference} \leq 20 \% površine_{LLOQ}$
Obnovljivost (u danu)	3 neovisne kalibracijske krivulje (na temelju šest uzastopnih razrjeđivanja 1/3 MTT formazana u izopropanolu, počevši s ULOQ-om, tj. 200 µg/ml) Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	Kalibracijske krivulje: $\%Dev \leq 15 \% \text{ ili } \leq 20 \% \text{ za LLOQ}$ Kontrole kvalitete: $\%Dev \leq 15 \% \text{ i } CV \leq 15 \%$
Obnovljivost (među dani-ma)	Prvi dan: 1: kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Drugi dan: 1: kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Treći dan: 1: kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3)	
Kratkoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhE	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon 24 sata skladištenja na sobnoj temperaturi	$\%Dev \leq 15 \%$
Dugoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhE, ako je potrebno	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon nekoliko dana skladištenja na utvrđenoj temperaturi (npr. 4 °C, -20 °C, -80 °C)	$\%Dev \leq 15 \%$

(¹) LLOQ: donja granica kvantifikacije, definirana tako da obuhvaća vijabilnost tkiva od 1 do 2 %, tj. 0,8 µg/ml.

(²) ULOQ: gornja granica kvantifikacije, definirana tako da bude barem dva puta veća od najviše očekivane koncentracije MTT formazana u ekstraktima izopropanola iz negativnih kontrola, tj. 200 µg/ml.

(7) u dijelu B poglavlje B.46. zamjenjuje se sljedećim:

„B.46. NADRAŽIVANJE KOŽE IN VITRO: ISPITNA METODA NA MODELU REKONSTRUIRANE LJUDSKE EPIDERME

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 439 (2015.). Nadraživanje kože odnosi se na izazivanje reverzibilnog oštećenja kože nakon primjene ispitivane kemikalije u trajanju do četiri sata [kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN)] (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) ⁽¹⁾ Europske unije. Ovom se ispitnom metodom pruža *in vitro* postupak koji se može upotrebljavati za identificiranje opasnosti nadražujućih kemikalija (tvari i smjesa) u skladu s 2. kategorijom UN GHS-a/CLP-a (2.). U regijama koje nisu donijele neobavezu 3. kategoriju UN GHS-a (blago nadražujuće kemikalije) ova se ispitna metoda može upotrebljavati i za identifikaciju nerazvrstanih kemikalija. Ovisno o regulatornom okviru i sustavu razvrstavanja koji se upotrebljava, ova se ispitna metoda stoga može upotrebljavati kako bi se utvrdilo nadražuje li kemikalija kožu, kao samostalno zamjensko ispitivanje za *in vivo* ispitivanje nadraživanja kože ili kao djelomično zamjensko ispitivanje u okviru strategije ispitivanja (3.).
2. Procjena nadraživanja kože dosad je obično obuhvaćala primjenu laboratorijskih životinja [ispitna metoda B.4., ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 404 koja je izvorno donesena 1981. i revidirana 1992., 2002. i 2015.] (4.). Za ispitivanje nagrizanja donesene su tri validirane ispitne metode *in vitro* – ispitna metoda EU-a B.40. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 430), ispitna metoda B.40.bis (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 431) i ispitna metoda B.65. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 435) (5., 6. i 7.). U Smjernicama OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nagrizanje i nadraživanje kože opisano je nekoliko modula u kojima se grupiraju izvori informacija i alati za analizu te se pružaju smjernice o i. načinu integriranja i uporabe postojećih podataka o ispitivanju i podataka koji se dobivaju bez ispitivanja za procjenu potencijala kemikalija da uzrokuju nadraživanje i nagrizanje kože te ii. predlaganju pristupa kad je potrebno daljnje ispitivanje (3.).
3. Ova se ispitna metoda bavi konačnim učinkom nadraživanja kože na zdravlje ljudi. Temelji se na *in vitro* ispitnom sustavu rekonstruirane ljudske epiderme (RhE) koja vjerno oponaša biokemijska i fiziološka svojstva gornjih slojeva ljudske kože, tj. epiderme. U ispitnom sustavu RhE ljudski netransformirani epidermalni keratinociti upotrebljavaju se kao izvor stanica za rekonstrukciju modela epiderme s reprezentativnom histologijom i citoarhitekturom. Dostupni su zahtjevi izvedbe (PS) kako bi se olakšala validacija i procjena sličnih i izmijenjenih ispitnih metoda koje se temelje na modelu RhE, u skladu s načelima Smjernice OECD-a br. 34 (8. i 9.). Odgovarajuća smjernica za ispitivanje izvorno je donesena 2010. i ažurirana 2013. kako bi se uključili dodatni modeli RhE, a 2015. ažurirana je kako bi se uputilo na smjernice o IATA-i i uveo alternativni postupak za mjerenje vijabilnosti.
4. Za četiri komercijalno dostupna *in vitro* ispitna modela dovršene su predvalidacijske, optimizacijske i validacijske studije (10., 11., 12., 13., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 22., 23., 24., 25., 26., 27. i 28.) na temelju ispitnog sustava RhE (osjetljivost od 80 %, specifičnost od 70 % i točnost od 75 %). Ta četiri ispitna modela uključena su u ovu ispitnu metodu i navedena su u Dodatku 2., u kojem se navode i informacije o vrsti validacijske studije koja je upotrijebljena za validaciju odgovarajućih ispitnih metoda. Kako je navedeno u Dodatku 2., za razvoj ove ispitne metode i zahtjeva izvedbe upotrijebljena je validirana referentna metoda (VRM) (8.).
5. OECD-ovo uzajamno prihvaćanje podataka jamčit će se samo za ispitne modele koji su validirani u skladu sa zahtjevima izvedbe (8.) ako je OECD pregledao i donio te ispitne modele. Ispitni modeli uključeni u ovu ispitnu metodu i odgovarajuća smjernica OECD-a za ispitivanje mogu se upotrebljavati bez razlike za ispunjavanje zahtjeva zemalja u pogledu rezultata ispitivanja iz ispitnih metoda *in vitro* za nadraživanje kože, uz ostvarivanje koristi od uzajamnog prihvaćanja podataka.
6. Definicije pojmova upotrijebljenih u ovom dokumentu navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

7. Ograničenje je ove ispitne metode, kako je pokazala cjelokupna prospektivna validacijska studija u kojoj su procijenjene i okarakterizirane ispitne metode RhE (16.), to što ne omogućuje razvrstavanje kemikalija na neobavezu 3. kategoriju UN GHS-a (blago nadražujuće kemikalije) (1.). Stoga se o načinu upotrebe ove ispitne metode odlučuje regulatornim okvirom zemalja članica. Kad je riječ o EU-u, u CLP-u nije upotrijebljena 3. kategorija. Za potpunu evaluaciju lokalnih učinaka na kožu nakon jednostrukog dermalnog izlaganja potrebno je proučiti Smjernice OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (3.). Podrazumijeva se da upotreba ljudske kože podliježe nacionalnim i međunarodnim etičkim pitanjima i uvjetima.

8. Ova se ispitna metoda bavi konačnim učinkom nadraživanja kože na zdravlje ljudi. Iako se ovom ispitnom metodom ne dobivaju primjerene informacije o nagrizanju kože, trebalo bi napomenuti da se ispitna metoda B.40.bis (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 431) za nagrizanje kože temelji na istom ispitnom sustavu RhE uz upotrebu drugog protokola (6.). Ova se ispitna metoda temelji na modelima RhE koristeći ljudske keratinocite koji stoga predstavljaju *in vitro* ciljni organ vrste koja se proučava. Pored toga neposredno uključuje početnu fazu upalne kaskade/mehanizma djelovanja (oštećenje stanica i tkiva koje dovodi do lokalizirane ozljede) koja se javlja tijekom nadraživanja *in vivo*. Tijekom validacijske studije na kojoj se temelji ova ispitna metoda ispitan je širok raspon kemikalija, a bazom podataka validacijske studije bilo je obuhvaćeno ukupno 58 kemikalija (16., 18. i 23.). Ispitna metoda primjenjiva je na krute tvari, tekućine, polukrute tvari i voskove. Tekućine mogu biti vodene i bezvodne; krute tvari mogu biti topljive ili netopljive u vodi. Krute tvari prije primjene treba samljeti u sitni prah kad je god moguće; nije potrebno nikakvo drugo prethodno tretiranje uzorka. Plinovi i aerosoli još nisu ocijenjeni u validacijskoj studiji (29.). Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom tehnologije RhE, trenutačnom ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje plinova i aerosola.
9. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Međutim, budući da smjese obuhvaćaju široki spektar kategorija i sastava te da su trenutačno dostupne samo ograničene informacije o ispitivanju smjesa, u slučajevima u kojima se može dokazati da se ispitna metoda ne može primijeniti za ispitivanje specifične kategorije smjesa (npr. primjenom strategije koju su predložili Eskes i dr., 2012. (30.)), ispitnu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za tu specifičnu kategoriju smjesa. Slično tome, trebalo bi o tome voditi računa ako se za određene kemijske razrede ili fizikalno-kemijska svojstva utvrdi da nisu primjenjivi na trenutačnu ispitnu metodu.
10. Ispitivane kemikalije koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan i ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati vitalnu boju MTT (na MTT formazan) mogu ometati mjerenje vijabilnosti stanica te se kod njih trebaju upotrebljavati prilagođene kontrole za ispravke (vidjeti stavke 28.–34.).
11. Jedan ciklus ispitivanja koji obuhvaća tri ponovljena uzorka tkiva trebao bi biti dovoljan za ispitivanu kemikaliju ako je razvrstavanje nedvosmisleno. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja i/ili srednji postotak vijabilnosti od 50 ± 5 %, trebalo bi razmotriti drugi ciklus, a i treći ciklus u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva ciklusa.

NAČELO ISPITIVANJA

12. Ispitivana se kemikalija lokalno nanosi na trodimenzionalni model RhE, koji čine netransformirani ljudski epidermalni keratinociti uzgojeni u svrhu dobivanja višeslojnog, visoko izdiferenciranog modela ljudske epiderme. Sastoji se od organiziranih bazalnih, trnastih i znatih slojeva te višeslojnog rožnatog sloja (*stratum corneum*) koji između stanica sadržava lamelarne masne slojeve koji predstavljaju glavne razrede lipida analogne onima koji se susreću *in vivo*.
13. Kemijski inducirano nadraživanje kože, koje se uglavnom očituje u pojavi eritema i edema, rezultat je kaskade događaja koja započinje prodiranjem kemikalija u rožnati sloj gdje mogu oštetiti niže slojeve keratinocita i druge stanice kože. Oštećene stanice mogu otpuštati upalne posrednike ili inducirati upalnu kaskadu koja djeluje i na stanice derme, a posebno stromalne i endotelne stanice krvnih žila. Zamijećeni eritemi i edemi (29.) posljedica su dilatacije i povećane propusnosti endotelnih stanica. Točnije, ako u *in vitro* ispitnom sustavu ne postoji nikakva vaskularizacija, metode na temelju rekonstruirane ljudske epiderme mjere početne događaje u kaskadi, npr. oštećenje stanica/tkiva (16. i 17.) upotrebom vijabilnosti stanica kao očitavanja.
14. Vijabilnost stanica u modelima RhE mjeri se enzimskom konverzijom vitalne boje MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil plavo; CAS broj 298-93-1] u sol plavog formazana koja se kvantitativno mjeri nakon ekstrakcije iz tkiva (31.). Nadražujuće kemikalije prepoznaju se po tome što smanjuju vijabilnost stanica ispod definiranih pragova (tj. ≤ 50 % za 2. kategoriju UN GHS-a). Ovisno o regulatornom okviru i primjenjivosti ispitne metode, ispitivane kemikalije kod kojih je vijabilnost stanica iznad definiranog praga mogu se smatrati tvarima koje ne nadražuju (tj. > 50 %, bez kategorije).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

15. Prije rutinske primjene bilo kojeg od četiriju validiranih ispitnih modela koji su u skladu s ovom ispitnom metodom (Dodatak 2.) laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost upotrebom deset tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti koje su navedene u tablici 1. U slučajevima u kojima, na primjer, navedena tvar nije dostupna, može se upotrijebiti druga tvar za koju su dostupni primjereni referentni *in vivo* i *in vitro* podaci (npr. s popisa referentnih kemikalija (8.)) pod uvjetom da se primjenjuju isti kriteriji za odabir kao oni opisani u tablici 1. Upotrebu alternative tvari koja služi za dokazivanje osposobljenosti trebalo bi opravdati.
16. U okviru ispitivanja osposobljenosti preporučuje se da korisnici po primitku provjere svojstva barijere tkiva u skladu sa specifikacijama proizvođača modela RhE. To je posebno važno ako se tkiva šalju na velike udaljenosti/tijekom dugih vremenskih razdoblja. Nakon što se metoda uspješno uspostavi te nakon što se stekne i dokaže osposobljenost u pogledu njezine uporabe, takva rutinska provjera neće biti potrebna. Međutim, kod rutinske uporabe ispitne metode preporučuje se daljnje ocjenjivanje svojstava barijere u pravilnim vremenskim intervalima.

Tablica 1.

Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti ⁽¹⁾

Tvar	CAS br.	Rezultat ocjenjivanja <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Agregatno stanje	Kategorija sustava UN GHS-a
------	---------	---	------------------	-----------------------------

NERAZVRSTANE TVARI (bez kategorije prema UN GHS-u)

naftalenoctena kiselina	86-87-3	0	Kruto	Bez kat.
izopropanol	67-63-0	0,3	Tekuće	Bez kat.
metil-stearat	112-61-8	1	Kruto	Bez kat.
heptilbutirat	5870-93-9	1,7	Tekuće	Bez kat. (Neobavezna 3. kat.) ⁽³⁾
heksilsalicilat	6259-76-3	2	Tekuće	Bez kat. (Neobavezna 3. kat.) ⁽³⁾

RAZVRSTANE TVARI (2. kategorija sustava UN GHS-a)

ciklamen-aldehid	103-95-7	2,3	Tekuće	2. kat.
1-bromheksan	111-25-1	2,7	Tekuće	2. kat.
kalijev hidroksid (5 % aq.)	1310-58-3	3	Tekuće	2. kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	3,3	Kruto	2. kat.
heptanal	111-71-7	3,4	Tekuće	2. kat.

⁽¹⁾ Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti su podskupina tvari koje se upotrebljavaju u validacijskoj studiji, a odabir se temelji na sljedećim kriterijima: i. kemijske tvari komercijalno su dostupne; ii. reprezentativne su za cijelo područje vrijednosti nadraživanja prema Draizeu (od nenadražujuće do jako nadražujuće); iii. imaju dobro definiranu kemijsku strukturu; iv. reprezentativne su za kemijsku funkcionalnost koja je korištena u validacijskom postupku; v. dovele su do ponovljivih rezultata *in vitro* u više ispitivanja i više laboratorija; vi. točno su predviđene *in vitro* i vii. nemaju ekstremni toksični profil (npr. kancerogeno ili reproduktivno toksično djelovanje) i nisu povezane s neprimjereno visokim troškovima zbrinjavanja.

⁽²⁾ Rezultat ocjenjivanja *in vivo* u skladu s ispitnom metodom B.4. (4.).

⁽³⁾ U okviru ove ispitne metode neobavezna 3. kategorija UN GHS-a (blago nadražujuće kemikalije) (1.) smatra se kao „bez kategorije”.

POSTUPAK

17. U nastavku se nalazi opis elemenata i postupaka u vezi s ispitnom metodom RhE za potrebe ocjenjivanja nadraživanja kože (vidjeti i Dodatak 3. za parametre povezane sa svakim ispitnim modelom). Dostupni su standardni operativni postupci za četiri modela koja su usklađena s ovom ispitnom metodom (32., 33., 34. i 35.).

ELEMENTI ISPITNE METODE RHE

Opći uvjeti

18. Za rekonstruiranje epitela treba koristiti netransformirane ljudske keratinocite. Ispod funkcionalnog rožnatog sloja (*stratum corneum*) nalaze se višestruki slojevi vijabilnih epitelnih stanica (bazalni sloj, trnasti sloj, zrnati sloj). I sam rožnati sloj je višeslojan te sadržava esencijalni profil lipida kao čvrstu funkcionalnu barijeru koja je sposobna zaustaviti brzi prodor citotoksičnih referentnih kemikalija, npr. natrijev dodecil-sulfat (SDS) ili Triton X-100. Funkciju barijere trebalo bi dokazati i može se ocijeniti određivanjem koncentracije referentne kemikalije pri kojoj se smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % (IC_{50}) nakon fiksnog vremena izlaganja ili određivanjem vremena izlaganja koje je potrebno da se vijabilnost stanica smanji za 50 % (ET_{50}) nakon primjene referentne kemikalije u unaprijed određenoj fiksnoj koncentraciji. Model RhE mora biti dovoljno nepropustan da spriječi prolazak materijala oko rožnatog sloja do vijabilnog tkiva jer bi to dovelo do lošeg modeliranja izlaganja kože. Model RhE ne smije biti onečišćen bakterijama, virusima, mikoplazmama ili gljivicama.

Funkcionalni uvjeti*Vijabilnost*

19. Za kvantifikaciju vijabilnosti upotrebljava se MTT test (31.). Vijabilne stanice modela tkiva RhE mogu reducirati vitalnu boju MTT u talog plavog MTT formazana, koji se zatim ekstrahira iz tkiva izopropanolom (ili sličnim otapalom). Optička gustoća (OD) samog ekstrakcijskog otapala treba biti dovoljno mala, tj. $OD < 0,1$. Ekstrahirani MTT formazan može se kvantificirati upotrebom mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupkom HPLC/UPLC spektrofotometrije (36.). Korisnici modela RhE trebali bi osigurati da svaka šarža modela RhE koji se upotrebljava ispunjava utvrđene kriterije za negativnu kontrolu. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole (u uvjetima ispitne metode za ocjenjivanje nadraživanja kože) utvrđuje subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač tog modela. Rasponi prihvatljivosti za četiri validirana modela RhE uključena u ovu ispitnu metodu navedeni su u tablici 2. Korisnik HPLC/UPLC spektrofotometrije trebao bi upotrebljavati raspon optičke gustoće negativne kontrole navedene u tablici 2. kao kriterij prihvatljivosti za negativnu kontrolu. Potrebno je dokumentirati da su tkiva obrađena negativnom kontrolom stabilna u kulturi (tj. daju slična mjerenja vijabilnosti) za vrijeme trajanja ispitnog izlaganja.

Tablica 2.

Rasponi prihvatljivosti za vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole ispitnih modela uključenih u ovu ispitnu metodu

	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EpiSkin™ (standardna metoda)	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	$\geq 0,8$	$\leq 2,8$
SkinEthic™ RHE	$\geq 0,8$	$\leq 3,0$
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	$\geq 0,7$	$\leq 2,5$

Funkcija barijere

20. Rožnati sloj i njegov sastav lipida trebao bi biti sposoban zaustaviti brzi prodor citotoksičnih referentnih kemikalija, npr. SDS ili Triton X-100, procijenjeno na temelju IC_{50} ili ET_{50} (tablica 3.).

Morfologija

21. U izvedbi histološkog pregleda modela RhE treba se dokazati da je struktura slična strukturi ljudske epiderme (uključujući višeslojni rožnati sloj).

Obnovljivost

22. Rezultati pozitivne i negativne kontrole ispitne metode trebaju dokazati obnovljivost tijekom vremena.

Kontrola kvalitete (KK)

23. Model RhE trebao bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji ga je razvio ili dobavljač dokaže da svaka šarža upotrijebljenog modela RhE ispunjava definirane kriterije za odobrenje proizvoda, među kojima su najvažniji *vijabilnost* (stavak 19.), *funkcija barijere* (stavak 20.) i *morfologija* (stavak 21.). Ti bi se podaci trebali dostaviti korisnicima ispitne metode tako da ih mogu uključiti u izvješće o ispitivanju. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za IC₅₀ ili ET₅₀ trebao bi utvrditi subjekt koji je razvio model RhE ili dobavljač tog modela. Za pouzdano predviđanje razvrstavanja nadražujućih učinaka prihvatljivi su isključivo rezultati dobiveni s tkivima koja ispunjavaju zadane kriterije. Rasponi prihvatljivosti za četiri ispitna modela uključena u ovu ispitnu metodu navedeni su u tablici 3.

Tablica 3.

Kriteriji za kontrolu kvalitete šarže ispitnih modela uključenih u ovu ispitnu metodu

	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EpiSkin™ (standardna metoda) (18-satno tretiranje SDS-om) (32.)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33.)	ET ₅₀ = 4,0 h	ET ₅₀ = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34.)	ET ₅₀ = 4,0 h	ET ₅₀ = 10,0 h
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18-satno tretiranje SDS-om) (35.)	IC ₅₀ = 1,4 mg/ml	IC ₅₀ = 4,0 mg/ml

Primjena ispitivane kemikalije i kontrolnih kemikalija

24. Za svaku ispitivanu kemikaliju i za kontrole trebalo bi upotrijebiti najmanje tri ponovljena uzorka u svakom ciklusu. I kod tekućina i kemikalija u krutom stanju treba primijeniti dovoljnu količinu ispitivane kemikalije kako bi se ravnomjerno pokrila površina epiderme tako da se izbjegne beskonačna doza, tj. trebalo bi upotrijebiti dozu od 26 do 83 µl/cm² ili mg/cm² (vidjeti Dodatak 3.). Kod kemikalija u krutom stanju površinu epiderme trebalo bi navlažiti deioniziranom ili destiliranom vodom prije primjene kako bi se poboljšao kontakt između ispitivane kemikalije i površine epiderme. Kad je god moguće, kemikalije u krutom stanju treba ispitivati u obliku sitnog praha. U određenim se slučajevima kao pomoć pri nanošenju može upotrijebiti najlonska mreža (vidjeti Dodatak 3.). Na kraju razdoblja izlaganja ispitivanu kemikaliju treba pažljivo isprati s površine epiderme vodenom puferском otopinom ili 0,9-postotnom NaCl. Ovisno o ispitnom modelu RhE koji se upotrebljava, razdoblje izlaganja kreće se od 15 do 60 minuta, a temperatura inkubacije od 20 do 37 °C. Ta razdoblja izlaganja i temperature optimiziraju se za svaku pojedinačnu ispitnu metodu RhE i predstavljaju različita intrinzična svojstva ispitnih modela (npr. funkciju barijere) (vidjeti Dodatak 3.).
25. U svakom bi se ciklusu trebale upotrebljavati istodobne negativne i pozitivne kontrole kako bi se dokazalo da su vijabilnost (upotrebom negativne kontrole), funkcija barijere i posljedična osjetljivost tkiva (upotrebom pozitivne kontrole) unutar prihvatljivog raspona utvrđenog na temelju rezultata prijašnjih ispitivanja. Predlaže se da se kao pozitivna kontrola koristi 5-postotna vodena otopina SDS. Predložene su negativne kontrole voda ili fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS).

Mjerenja vijabilnosti stanica

26. Prema ispitnom postupku od ključne je važnosti da se mjerenje vijabilnosti ne provodi neposredno nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji, već nakon dovoljno dugog razdoblja inkubacije nakon tretiranja tijekom koje se oprana tkiva drže u svježem mediju. Ova faza ostavlja dovoljno vremena da se tkivo oporavi od blagih citotoksičnih učinaka, ali i da se pojave jasni znakovi citotoksičnih učinaka. U fazi optimizacije testa dvaju ispitnih modela na temelju RhE na kojima se temelji ova ispitna metoda pokazalo se da optimalno razdoblje inkubacije nakon tretiranja iznosi 42 sata (11., 12., 13., 14. i 15.).
27. MTT test je standardizirana kvantitativna metoda koja bi se trebala upotrebljavati za mjerenje vijabilnosti stanica na temelju ove ispitne metode. Taj je test prikladan za trodimenzionalni model tkiva. Uzorak tkiva stavi se u otopinu MTT odgovarajuće koncentracije (npr. 0,3–1 mg/ml) i ostavi u njoj tri sata. Vijabilne stanice pretvaraju MTT u plavi formazan. Nataloženi plavi formazan zatim se ekstrahira iz tkiva s pomoću otapala (npr. izopropanol, kiseli izopropanol) i koncentracija formazana izmjeri se određivanjem vrijednosti OD na 570 nm uz pojas propuštanja do najviše ± 30 nm ili upotrebom postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavak 34.) (36.).
28. Optička svojstva ispitivane kemikalije ili njezino kemijsko djelovanje na MTT (npr. kemikalije mogu spriječiti ili obrnuti proces nastajanja boje, ali ga i izazvati) mogu ometati test i dovesti do pogrešne procjene vijabilnosti. To se može dogoditi kad se određena ispitivana kemikalija ne spere u potpunosti s tkiva ili prođe u epidermu. Ako ispitivana kemikalija izravno djeluje na MTT (npr. redukcijom MTT-a), prirodno je obojena ili se oboji tijekom tretiranja tkiva, treba upotrijebiti dodatne kontrole kako bi se utvrdila i ispravila interferencija ispitivane kemikalije s mjernom tehnikom koja se koristi za mjerenje vijabilnosti (vidjeti stavke 29. i 33.) Podroban opis načina na koji se ispravljaju izravna redukcija MTT-a i interferencije bojila dostupan je u standardnim operativnim postupcima za četiri validirana modela uključena u ovu ispitnu metodu (32., 33., 34. i 35.).
29. Kako bi se identificirale kemikalije koje izravno reduciraju MTT, svaku bi ispitivanu kemikaliju trebalo dodati u svježe pripremljenu otopinu MTT-a. Ako smjesa MTT-a koja sadržava ispitivanu kemikaliju postane plava/ljubičasta, pretpostavlja se da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT i treba se provesti daljnja funkcionalna provjera nevijabilnih tkiva RhE, neovisno o upotrebi mjerenja standardne apsorancije (OD) ili postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije. U toj dodatnoj funkcionalnoj provjeri upotrebljavaju se mrtva tkiva kod kojih je prisutna samo preostala metabolička aktivnost, ali koja apsorbiraju ispitivanu kemikaliju na sličan način kao vijabilna tkiva. Svaka ispitivana kemikalija koja reducira MTT primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja kako bi se dobila nespecifična redukcija MTT-a (NSMTT) (32., 33., 34. i 35.). Dovoljna je jedna kontrola NSMTT po ispitivanoj kemikaliji neovisno o broju provedenih neovisnih ispitivanja/ciklusa. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih tvari koja reducira MTT umanjeno za postotak nespecifične redukcije MTT-a dobivene s mrtvim tkivima izloženima istoj tvari koja reducira MTT, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSMTT).
30. Kako bi se identificirala potencijalna interferencija obojenih ispitivanih kemikalija ili ispitivanih kemikalija koje se oboje kad dođu u dodir s vodom ili izopropanolom i odlučilo jesu li potrebne dodatne kontrole, trebalo bi provesti spektralnu analizu ispitivane kemikalije u vodi (okoliš tijekom izlaganja) i/ili izopropanolu (otopina za ekstrahiranje). Ako ispitivana kemikalija u vodi i/ili izopropanolu apsorbira svjetlost u rasponu od 570 $\pm$ 30 nm, trebalo bi provesti daljnje kontrole bojila ili bi, kao alternativu, trebalo primijeniti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije; u potonjem slučaju te kontrole nisu potrebne (vidjeti stavke 33. i 34.). Pri provedbi mjerenja standardne apsorancije (OD), svaka interferirajuća obojena ispitivana kemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka vijabilnog tkiva, koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne otopinom MTT-a, kako bi nastala kontrola nespecifične boje (NSC_{living}). Kontrolu NSC_{living} treba obavljati istodobno s ispitivanjem obojene ispitivane kemikalije, a u slučaju više ispitivanja treba provesti neovisnu kontrolu NSC_{living} sa svakim provedenim ispitivanjem (u svakom ciklusu) zbog svojstvene biološke varijabilnosti živih tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranih s otopinom MTT-a, umanjeno za postotak nespecifične boje dobiven sa živim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranim s medijem bez MTT-a, što se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja (%NSC_{living}).
31. Za ispitivane kemikalije za koje se utvrdi da uzrokuju i izravnu redukciju MTT-a (vidjeti stavak 29.) i interferenciju s bojom (vidjeti stavak 30.) pri mjerenju standardne apsorancije (OD) bit će potreban i treći skup kontrola, uz kontrole NSMTT i NSC_{living} opisane u prethodnim stavcima. To je obično slučaj kod tamno obojenih ispitivanih kemikalija koje interferiraju s MTT testom (npr. plave, ljubičaste ili crne kemikalije) jer njihova intrinzična boja sprečava procjenu njihove sposobnosti da izravno reduciraju MTT, kako je opisano u stavku 29. Te se ispitivane kemikalije mogu vezati i na živa i na mrtva tkiva te se stoga kontrolom NSMTT može ispraviti ne samo potencijalna izravna redukcija MTT-a ispitivanom kemikalijom, već i interferencija s

bojom koja je posljedica vezanja ispitivane kemikalije na mrtva tkiva. To bi moglo dovesti do dvostrukog ispravka za interferenciju s bojom jer se kontrolom NSC_{living} već ispravlja interferencija s bojom koja je posljedica vezanja ispitivane kemikalije na živa tkiva. Kako bi se izbjegao mogući dvostruki ispravak za interferenciju s bojom, treba provesti treću kontrolu za nespecifičnu boju u mrtvim tkivima (NSC_{killed}). U toj dodatnoj kontroli ispitivana kemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva, koja se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju medijem, a ne otopinom MTT-a. Dovoljna je jedna kontrola NSC_{killed} po ispitivanoj kemikaliji neovisno o broju provedenih neovisnih ispitivanja/ciklusa, ali treba je provoditi istodobno s kontrolom NSMTT i, ako je moguće, s istom šaržom tkiva. Prava vijabilnost tkiva zatim se računa kao postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih ispitivanoj kemikaliji umanjeno za %NSMTT i $\%NSC_{\text{living}}$ te uvećano za postotak nespecifične boje dobiven s mrtvim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranim medijem bez MTT-a, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kad i ispitivanje koje se ispravlja ($\%NSC_{\text{killed}}$).

32. Važno je napomenuti da nespecifična redukcija MTT-a i nespecifična interferencija s bojom mogu povećati očitavanja ekstrakta tkiva izvan raspona linearnosti spektrofotometra. Na temelju toga svaki bi laboratorij prije početka ispitivanja ispitivanih kemikalija u regulatorne svrhe trebao utvrditi raspon linearnosti svojeg spektrofotometra s MTT formazanom (CAS # 57360-69-7) iz komercijalnog izvora. Mjerenje standardne apsorbancije (OD) upotrebom spektrofotometra primjereno je za procjenu tvari koje izravno reduciraju MTT i ispitivanih kemikalija koje interferiraju s bojom ako je optička gustoća ekstrakata tkiva dobivena ispitivanom kemikalijom bez ikakvih ispravaka za izravnu redukciju MTT-a i/ili interferencija s bojom unutar linearnog raspona spektrofotometra ili ako je neispravljeni postotak vijabilnosti dobiven ispitivanom kemikalijom već $\leq 50\%$. Ipak, rezultate za ispitivane kemikalije koji daju %NSMTT i/ili $\%NSC_{\text{living}} \geq 50\%$ negativne kontrole trebalo bi oprezno tumačiti jer je to granična vrijednost koja se upotrebljava za razlikovanje razvrstanih i nerazvrstanih kemikalija (vidjeti stavak 36.).
33. Kod obojenih ispitivanih kemikalija koje nisu kompatibilne s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) zbog prejake interferencije s MTT testom, za mjerenje MTT formazana može se upotrijebiti alternativni postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavak 34.) (36.). Sustav HPLC/UPLC spektrofotometrije omogućuje izdvajanje MTT formazana iz ispitivane kemikalije prije njegove kvantifikacije (36.). Zato pri upotrebi HPLC/UPLC spektrofotometrije nikada nisu potrebne kontrole NSC_{living} i NSC_{killed} , neovisno o kemikaliji koja se ispituje. Kontrole NSMTT ipak bi se trebale upotrijebiti ako se sumnja u to da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT ili ima boju koja sprečava procjenu sposobnosti izravne redukcije MTT-a (kako je opisano u stavku 29.). Ako se za mjerenje MTT formazana upotrebljava HPLC/UPLC spektrofotometrija, postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobiven s istodobnom negativnom kontrolom. Za ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati MTT prava vijabilnost tkiva računa se kao postotak vijabilnosti tkiva dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji umanjeno za %NSMTT. Naposljetku, treba napomenuti da se ne mogu procijeniti tvari koje izravno reduciraju MTT i koje ujedno mogu interferirati s bojom, koje se zadržavaju u tkivima nakon tretiranja i reduciraju MTT toliko jako da dovode do optičke gustoće (upotrebom mjerenja standardne optičke gustoće) ili površina pika (upotrebom UPLC/HPLC spektrofotometrije) ispitivanih ekstrakata tkiva koji su izvan raspona linearnosti spektrofotometra, iako do toga dolazi samo u iznimno rijetkim slučajevima.
34. HPLC/UPLC spektrofotometrija može se upotrebljavati i sa svim vrstama ispitivanih kemikalija (obojenima i neobojenima, koje reduciraju MTT i koje ga ne reduciraju) za mjerenje MTT formazana (36.). Zbog raznolikosti sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije, kvalifikaciju sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije trebalo bi dokazati prije njegove upotrebe za kvantificiranje MTT formazana iz ekstrakata tkiva tako da sustav ispunji kriterije prihvatljivosti za skup standardnih parametara kvalifikacije u skladu s parametrima opisanim u smjernicama američke Uprave za hranu i lijekove o validaciji bioanalitičkih metoda namijenjenih industriji (36. i 37.). Ti ključni parametri i njihovi kriteriji prihvatljivosti prikazani su u Dodatku 4. Kad se ispune kriteriji prihvatljivosti definirani u Dodatku 4., smatra se da je sustav HPLC/UPLC spektrofotometrije kvalificiran i spreman za mjerenje MTT formazana u pokusnim uvjetima opisanim u ovoj ispitnoj metodi.

Kriteriji prihvatljivosti

35. U svakoj ispitnoj metodi u kojoj se upotrebljavaju valjane šarže modela RhE (vidjeti stavak 23.) vrijednost optičke gustoće tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi ukazivati na kvalitetu tkiva nakon što su dovršeni svi koraci dopreme i preuzimanja te svi postupci protokola. Vrijednosti optičke gustoće kontrola ne bi smjele biti ispod prijašnjih propisanih granica. Isto tako, tkiva tretirana pozitivnom kontrolom, tj. 5-postotnom vodenom otopinom SDS, trebaju pokazivati sposobnost da reagiraju na nadražujuću kemikaliju u uvjetima ispitne metode (vidjeti Dodatak 3., a za daljnje informacije i standardne operative postupke četiriju ispitnih modela uključenih u ovu smjernicu za ispitivanje (32., 33., 34. i 35.)). Povezane i odgovarajuće mjere varijabilnosti između tkiva u ponavljanjima, tj. standardne devijacije, trebaju biti unutar granica prihvatljivosti utvrđenih za ispitni model koji se upotrebljava (vidjeti Dodatak 3.).

Tumačenje rezultata i model predviđanja

36. Vrijednosti optičke gustoće dobivene sa svakom ispitivanom kemikalijom mogu se koristiti za izračun postotka vijabilnosti normaliziranog u odnosu na negativnu kontrolu, koja je određena kao 100 %. U slučaju upotrebe HPLC/UPLC spektrofotometrije postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobiven s istodobnom negativnom kontrolom. Potrebno je jasno utvrditi i dokumentirati graničnu vrijednost postotka vijabilnosti stanica koja se koristi za razlikovanje nadražujućih kemikalija od nerazvrstanih ispitivanih kemikalija te statistički postupak ili postupke koji su korišteni za ocjenjivanje rezultata i identifikaciju nadražujućih kemikalija te dokazati njihovu prikladnost (informacije potražiti u standardnim operativnim postupcima ispitnih modela). Granične vrijednosti za predviđanje nadraživanja navedene su u nastavku:

- smatra se da je za ispitivanu kemikaliju potrebno razvrstavanje i označivanje u skladu s UN GHS-om ili CLP-om (2. kategorija ili 1. kategorija) ako je srednji postotak vijabilnosti tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon tretiranja manji ili jednak ($\leq$) 50 %. Budući da se ispitnim modelima RhE obuhvaćenima ovom ispitnom metodom ne mogu razlikovati 1. i 2. kategorija sustava UN GHS-a ili CLP-a, bit će potrebne dodatne informacije o nagrizanju kože kako bi se odlučilo o konačnom razvrstavanju [vidjeti i Smjernice OECD-a o IATA-i (3.)]. Ako se utvrdi da ispitivana kemikalija nije nagrizajuća (npr. na temelju ispitne metode TM.40., B.40.bis ili B.65.) i pokazuje vijabilnost tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon tretiranja manju od ili jednaku ($\leq$) 50 %, ispitivana kemikalija smatra se nadražujućom za kožu u skladu s 2. kategorijom UN GHS-a ili CLP-a,
- ovisno o regulatornom okviru zemalja članica, može se smatrati da ispitivana kemikalija nije nadražujuća za kožu u skladu s oznakom „bez kategorije” UN GHS-a ili CLP-a ako je vijabilnost tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon tretiranja viša od ($>$) 50 %.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

37. Podatke pojedinačnih ponavljanja uzoraka tkiva u svakom ciklusu (npr. vrijednosti OD i podatke o izračunanom postotku vijabilnosti stanica za svaku ispitivanu kemikaliju, zajedno s razvrstavanjem) treba prikazati u tabličnom obliku, uključujući eventualne podatke iz ponovljenih pokusa. Osim toga, trebalo bi prijaviti i srednje vrijednosti $\pm$ standardno odstupanje za svaki ciklus. Za svaku ispitivanu kemikaliju treba navesti zapažene interakcije s MTT reagensom i obojenim ispitivanim kemikalijama.

Izvjeshće o ispitivanju

38. Izvjeshće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija i kontrolne kemikalije:

- tvar s jednim sastojkom: kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa: opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka,
- fizički izgled, topljivost u vodi i bilo koja druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- izvor, broj serije, ako su dostupni,
- tretiranje ispitivane kemikalije/kontrolnih kemikalija prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),
- stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,
- uvjeti skladištenja.

Model RhE i protokol koji se upotrebljavaju (te obrazloženje odabira, ako je primjenjivo)

Ispitni uvjeti:

- model RhE koji se upotrebljava (uključujući broj šarže),
- informacije o kalibraciji mjernog uređaja (npr. spektrofotometar), valna duljina i pojas propuštanja (ako je primjenjivo) koji se upotrebljavaju za kvantifikaciju MTT formazana te raspon linearnosti mjernog uređaja, opis metode koja se upotrebljava za kvantifikaciju MTT formazana,
- opis kvalifikacije sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije, ako je primjenjivo, potpune popratne informacije o konkretnom modelu RhE koji je korišten, uključujući njegove radne značajke. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:
 - i. vijabilnost;
 - ii. funkciju barijere;
 - iii. morfologiju;
 - iv. obnovljivost i prediktivnost;
 - v. kontrole kvalitete (KK) modela,
- upućivanje na prijašnje podatke za predmetni model. To bi, među ostalim, trebalo uključivati prihvatljivost podataka o kontroli kvalitete s upućivanjem na prijašnje podatke o šarži,
- dokazivanje osposobljenosti za izvođenje ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti.

Ispitni postupak:

- pojedinosti o upotrijebljenom ispitnom postupku (uključujući postupke ispiranja upotrijebljene nakon razdoblja izlaganja), doza upotrijebljene ispitne kemikalije i kontrola,
- trajanje i temperatura izlaganja i razdoblja inkubacije nakon izlaganja,
- oznake kontrola koje se koriste za tvari koje izravno reduciraju MTT i/ili ispitivane kemikalije za bojenje, ako je primjenjivo,
- broj ponavljanja uzoraka tkiva upotrijebljenih po ispitivanoj kemikaliji i kontrolama (pozitivna kontrola, negativna kontrola i NSMTT, NSC_{living} i NSC_{killed}, ako je primjenjivo),
- opis primijenjenih kriterija za odlučivanje/modela predviđanja na temelju upotrijebljenog RhE modela,
- opis mogućih izmjena ispitne metode (uključujući postupke ispiranja).

Kriteriji prihvatljivosti ciklusa i ispitivanja:

- srednje vrijednosti i rasponi prihvatljivosti pozitivnih i negativnih kontrola na temelju prijašnjih podataka, prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za pozitivne i negativne kontrole,
- prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za ispitivanu kemikaliju.

Rezultati:

- tablični prikaz podataka za pojedinačnu ispitivanu kemikaliju, za svaki ciklus i svako ponovljeno mjerenje, uključujući optičku gustoću ili površinu pika MTT formazana, postotak vijabilnosti tkiva, srednji postotak vijabilnosti tkiva i standardnu devijaciju,
- ako je primjenjivo, rezultati kontrola upotrijebljenih za tvari koje izravno reduciraju MTT i/ili ispitivane kemikalije za bojenje, uključujući optičku gustoću ili površinu pika MTT formazana, %NSMTT, %NSC_{living}, %NSC_{killed}, standardnu devijaciju te konačni točni postotak vijabilnosti tkiva,
- rezultati dobiveni s ispitivanom kemikalijom/kemikalijama i kontrolama u odnosu na utvrđene kriterije prihvatljivosti za ciklus i ispitivanje,
- opis drugih uočenih učinaka,
- utvrđeno razvrstavanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterije odlučivanja.

*Rasprava o rezultatima**Zaključci***LITERATURA**

1. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York i Ženeva, 2013. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
2. EURL-ECVAM (2009). Statement on the „Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards”, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9. travnja 2009. Dostupno na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf.
3. OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
4. Poglavlje B.4. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje kože.
5. Poglavlje B.40. ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: transkutani električni otpor (TER).
6. Poglavlje B.40.bis ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: ispitna metoda na modelu rekonstruirane ljudske epiderme (RhE).
7. Poglavlje B.65. ovog Priloga, *In vitro* ispitna metoda s membranskom barijerom.
8. OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
9. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

10. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol.in Vitro* 15, 57.–93.
11. Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol.in Vitro* 16, 765.–770.
12. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107.–114.
13. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351.–367.
14. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinstein, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329.–349.
15. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109.–129.
16. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559.–601.
17. Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α .
18. Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603.–619.
19. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351.–358.
20. EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27. travnja 2007. Dostupno na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf.
21. EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. Napomena: ovo su izvorni zahtjevi izvedbe korišteni za validaciju dviju ispitnih metoda. Ti zahtjevi izvedbe više se ne bi trebali upotrebljavati jer je sad dostupna ažurirana verzija (8.).
22. EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5. studenoga 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf.

23. OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
24. Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol Sci*, 34, 327.–334.
25. Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111.–122.
26. OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
27. OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
28. Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33.–50.
29. Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231.–243.
30. Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393.–403.
31. Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55.–63.
32. EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals.
33. EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).
34. SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.
35. LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model „LabCyte EPI-MODEL24“.
36. Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Rukopis u pripremi*.
37. US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Svibanj 2001. Dostupno na: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].

38. Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, u: Practical Contact Dermatitis, str. 7.–18. (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
39. EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Napomena: ovo je trenutačna verzija ECVAM-ovih zahtjeva izvedbe, ažuriranih 2009. s obzirom na provedbu UN GHS-a. Ti zahtjevi izvedbe više se ne bi trebali upotrebljavati jer je sad dostupna ažurirana verzija (8.) koja se odnosi na ovu smjernicu za ispitivanje.*
40. EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, izdao ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8. srpnja 2009.
41. EK (2001.) Direktiva Komisije 2001/59/EZ od 6. kolovoza 2001. o dvadeset osmoj prilagodbi tehničkom napretku Direktive Vijeća 67/548/EEZ o usklađivanju zakona i drugih propisa u odnosu na razvrstavanje, pakiranje i označivanje opasnih tvari, *Službeni list Europske unije* L225, 1.–333.

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (9.).

Vijabilnost stanica: parametar za mjerenje ukupne aktivnosti populacije stanica, npr. sposobnost staničnih mitohondrijskih dehidrogenaza da reduciraju vitalnu boju MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil plavo), koji, ovisno o krajnjoj točki koja se mjeri i planu ispitivanja, korelira s ukupnim brojem i/ili vitalnošću živih stanica.

Kemikalija: znači tvar ili smjesa.

Podudarnost: mjerilo učinkovitosti za ispitne modele koji daju kategorijski rezultat i jedan je od aspekata relevantnosti. Pojam je ponekad međusobno zamjenjiv s pojmom točnosti i definira se kao udio svih ispitanih kemikalija koje su pravilno razvrstane kao pozitivne ili negativne. Podudarnost u velikoj mjeri ovisi o prisutnosti pozitivnih rezultata u vrstama ispitivane kemikalije (9.).

ET₅₀: može se procijeniti utvrđivanjem vremena izlaganja potrebnog za smanjenje vijabilnosti stanica za 50 % nakon primjene referentne kemikalije u određenoj, fiksnoj koncentraciji; vidjeti i IC₅₀.

GHS (Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda (UN) za razvrstavanje i označivanje kemikalija): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti te opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (1.).

HPLC: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

IATA: integrirani pristup ispitivanju i procjeni.

IC₅₀: može se procijeniti utvrđivanjem koncentracije pri kojoj referentna kemikalija smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % (IC₅₀) nakon fiksnog vremena izlaganja; vidjeti i ET₅₀.

Beskonačna doza: količina ispitivane kemikalije primijenjena na epidermu koja je veća od količine potrebne da bi se potpuno i ravnomjerno pokrila površina epiderme.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil plavo tetrazolijev bromid.

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % (w/w) ili većoj te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

NSC_{killed}: nespecifična boja u mrtvim tkivima.

NSC_{living}: nespecifična boja u živim tkivima.

NSMTT: nespecifična redukcija MTT-a.

Zahtjevi izvedbe (PS): zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Uključuju: i. ključne elemente ispitne metode; ii. minimalni popis referentnih kemikalija odabranih među kemikalijama koje se upotrebljavaju za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode; i iii. usporedive razine točnosti i pouzdanosti koje mora pokazati predložena ispitna metoda kod ocjenjivanja primjenom minimalnog popisa referentnih kemikalija u odnosu na validiranu ispitnu metodu (9.).

PC: pozitivna kontrola; ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je kemikalijom za koju je poznato da inducira pozitivan odgovor. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživnog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitne metode (9.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija (9.).

Zamjensko ispitivanje: ispitivanje koje zamjenjuje rutinsko i prihvaćeno ispitivanje za određivanje opasnosti i/ili procjenu rizika, za koje je utvrđeno da osigurava istovjetnu ili bolju zaštitu zdravlja ljudi, zdravlja životinja ili okoliša u odnosu na prihvaćeno ispitivanje u svim mogućim okolnostima ispitivanja i za sve kemikalije (9.).

Ciklus: ciklus se sastoji od jedne ispitivane kemikalije ili više njih, koje se ispituju istodobno s negativnom i pozitivnom kontrolom.

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih ispitivanih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (9.).

Nadraživanje kože *in vivo*: izazivanje reverzibilnog oštećenja kože nakon primjene ispitivane kemikalije u trajanju do najviše četiri sata. Nadraživanje kože lokalna je reakcija pogođenog tkiva kože i javlja se ubrzo nakon podražaja (38.). Uzrokuje ju lokalna upalna reakcija koja uključuje unutarnji (nespecifični) imunološki sustav tkiva kože. Njezina je glavna značajka reverzibilan proces koji uključuje upalne reakcije i većinu karakterističnih kliničkih znakova nadraživanja (eritem, edem, svrbež i bol) koji se povezuju s upalnim procesom.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih ispitivanih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom testa. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (9.).

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnome stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

UPLC: tekućinska kromatografija iznimno visoke djelotvornosti.

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Dodatak 2.

ISPITNI MODELI UKLJUČENI U OVU ISPITNU METODU

Br.	Naziv ispitnog modela	Vrsta validacijske studije	Referentni dokumenti
1	EpiSkin™	Cjelokupna prospektivna validacijska studija (2003.–2007.). Elementi ovog modela upotrijebljeni su kako bi se definirali ključni elementi ispitne metode izvornih i ažuriranih ECVAM-ovih zahtjeva izvedbe (39., 40. i 21.) (*) . Osim toga, podaci dobiveni metodom koji se odnose na identifikaciju nerazvrstanih i razvrstanih tvari činili su glavnu osnovu za određivanje vrijednosti specifičnosti i osjetljivosti izvornih zahtjeva izvedbe (*) .	(2., 10., 11., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 23., 32., 39. i 40.)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (izvorno): ispitni model prvo je podvrgnut cjelokupnoj prospektivnoj validaciji zajedno s modelom br. 1 iz 2003.–2007. Elementi ovog modela upotrijebljeni su kako bi se definirali ključni elementi ispitnih metoda izvornih i ažuriranih ECVAM-ovih zahtjeva izvedbe (39., 40. i 21.) (*) . EpiDerm™ SIT (EPI-200): Izmjena izvornog modela EpiDerm™ validirana je 2008. upotrebom izvornih ECVAM-ovih zahtjeva izvedbe (21.) (*) .	(2., 10., 12., 13., 15., 16., 17., 18., 20., 21., 23., 33., 39. i 40.2., 21., 22., 23. i 33.))
3	SkinEthic™ RHE	Validacijska studija na temelju izvornih ECVAM-ovih zahtjeva izvedbe (21.) iz 2008. (*)	(2., 21., 22., 23. i 31.)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validacijska studija (2011.–2012.) na temelju zahtjeva izvedbe iz Smjernice OECD-a za ispitivanje 439 (8.), koji se temelje na ažuriranim ECVAM-ovim zahtjevima izvedbe (*) (39. i 40.).	(24., 25., 26., 27., 28., 35., 39. i 40.) te zahtjevima izvedbe ove smjernice za ispitivanje (8.) (*)

(*) Izvorni ECVAM-ovi zahtjevi izvedbe (21.) razvijeni su 2007. nakon dovršetka prospektivne validacijske studije (16.) u kojoj je procijenjena učinkovitost ispitnih modela br. 1 i 2 s obzirom na sustav razvrstavanja kako je opisan u 28. izmjeni Direktive EU-a o opasnim tvarima (41.). UN GHS-a (1.) i CLP EU-a uvedeni su 2008., pri čemu se granična vrijednost za razlikovanje nerazvrstanih i razvrstanih tvari zapravo pomaknula s rezultata ocjenjivanja *in vivo* od 2,0 na 2,3. Kako bi se prilagodili tom izmijenjenom regulatornom zahtjevu, vrijednosti točnosti i popis referentnih kemikalija ECVAM-ovih zahtjeva izvedbe ažurirani su 2009. (2., 39. i 40.). Kao i izvorni zahtjevi izvedbe, i ažurirani zahtjevi izvedbe u velikoj su se mjeri temeljili na podacima iz modela br. 1 i 2 (16.), ali su se uz to upotrebljavali i podaci o referentnim kemikalijama iz modela br. 3. Ažurirani ECVAM-ovi zahtjevi izvedbe iz 2010. upotrebljavali su se za propisivanje zahtjeva izvedbe povezanih s ovom smjernicom za ispitivanje (8.). Za potrebe ove ispitne metode validiranom referentnom metodom smatra se EpiSkin™ jer se koristio za razvoj svih kriterija zahtjeva izvedbe. Podrobne informacije o validacijskim studijama, skup dobivenih podataka i kontekst za potrebne prilagodbe zahtjeva izvedbe koje su posljedica provedbe UN GHS-a i CLP-a dostupne su u referentnom dokumentu s objašnjenjima uz odgovarajuću Smjernicu OECD-a za ispitivanje 439 (23.).

SIT: ispitivanje nadraživanja kože

RHE: rekonstruirana ljudska epiderma

Dodatak 3.

PARAMETRI PROTOKOLA SPECIFIČNI ZA SVAKI ISPITNI MODEL UKLJUČEN U OVU ISPITNU METODU

Modeli RhE imaju vrlo slične protokole i u svakom se modelu upotrebljava razdoblje nakon inkubacije od 42 sata (32., 33. 34. i 35.). Varijacije se uglavnom odnose na tri parametra povezana s različitim funkcijama barijere ispitnih modela i navedene su u nastavku: A) vrijeme i volumen prije inkubacije; B) primjena ispitne kemikalije i C) volumen nakon inkubacije.

	EpiSkin™ (standardna metoda)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
--	------------------------------	------------------------	----------------	-------------------------

A) Predinkubacija

Vrijeme inkubacije	18–24 h	18–24 h	< 2 h	15–30 h
Volumen medija	2 ml	0,9 ml	0,3 ili 1 ml	0,5 ml

B) Primjena ispitivane kemikalije

Za tekućine	10 µl (26 µl/cm ²)	30 µl (47 µl/cm ²)	16 µl (32 µl/cm ²)	25 µl (83 µl/cm ²)
Za krute tvari	10 mg (26 mg/cm ²) + DV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm ²) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm ²) + DV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm ²) + DV (25 µl)
Upotreba najlonske mreže	Ne upotrebljava se	Prema potrebi	Primijenjena	Ne upotrebljava se
Ukupno vrijeme primjene	15 minuta	60 minuta	42 minute	15 minuta
Temperatura primjene	ST	a) na sobnoj temperaturi 25 minuta b) na 37 °C 35 minuta	ST	ST

C) Volumen nakon inkubacije

Volumen medija	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
----------------	------	------------	------	------

D) Najveća prihvatljiva varijabilnost

Standardna devijacija između ponovljenih uzoraka tkiva	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18
--	---------	---------	---------	---------

ST: sobna temperatura

DV: destilirana voda

DPBS: Dulbeccova fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom

Dodatak 4.

KLJUČNI PARAMETRI I KRITERIJI PRIHVATLJIVOSTI ZA KVALIFIKACIJU SUSTAVA HPLC/UPLC SPEKTROFOTOMETRIJE ZA MJERENJE MTT FORMAZANA EKSTRAHIRANOG IZ TKIVA RHE

Parametar	Protokol izveden iz smjernica Uprave za hranu i lijekove (FDA) (36. i 37.)	Kriteriji prihvatljivosti
Selektivnost	Analiza izopropanola, slijepe probe na živom tkivu (ekstrakt izopropanola iz živih tkiva RHE bez ikakvog tretiranja), slijepe probe na mrtvom tkivu (ekstrakt izopropanola iz mrtvih tkiva RHE bez ikakvog tretiranja)	$Površina_{interference} \leq 20 \% površine_{LLOQ}^{(1)}$
Preciznost	Kontrole kvalitete (tj. MTT formazan pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml i 160 µg/ml) u izopropanolu (n = 5)	$CV \leq 15 \% \text{ ili } \leq 20 \% \text{ za LLOQ}$
Točnost	Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	$\%Dev \leq 15 \% \text{ ili } \leq 20 \% \text{ za LLOQ}$
Učinak matrice	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 5)	$85 \% \leq \text{učinak matrice kao } \% \leq 115 \%$
Prijenos	Analiza izopropanola nakon standardnog ULOQ ⁽²⁾	$Površina_{interference} \leq 20 \% površine_{LLOQ}$
Obnovljivost (u danu)	3 neovisne kalibracijske krivulje (na temelju šest uzastopnih razrjeđivanja 1/3 MTT formazana u izopropanolu, počevši s ULOQ-om, tj. 200 µg/ml) Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	Kalibracijske krivulje: $\%Dev \leq 15 \% \text{ ili } \leq 20 \% \text{ za LLOQ}$ Kontrole kvalitete: $\%Dev \leq 15 \% \text{ i } CV \leq 15 \%$
Obnovljivost (među danima)	Prvi dan: 1: kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Drugi dan: 1: kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Treći dan: 1: kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3)	
Kratkoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RHE	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon 24 sata skladištenja na sobnoj temperaturi	$\%Dev \leq 15 \%$
Dugoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RHE, ako je potrebno	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon nekoliko dana skladištenja na utvrđenoj temperaturi (npr. 4 °C, -20 °C, -80 °C)	$\%Dev \leq 15 \%$

⁽¹⁾ LLOQ: donja granica kvantifikacije, definirana tako da obuhvaća vijabilnost tkiva od 1 do 2 %, tj. 0,8 µg/ml.

⁽²⁾ ULOQ: gornja granica kvantifikacije, definirana tako da bude barem dva puta veća od najviše očekivane koncentracije MTT formazana u ekstraktima izopropanola iz negativnih kontrola, tj. 200 µg/ml;

(8) u dijelu B dodaju se sljedeća poglavlja:

„B.63. TEST PROBIRA ZA REPRODUKTIVNU/RAZVOJNU TOKSIČNOST

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 421 (TG) (2016.). Smjernice OECD-a za ispitivanje kemikalija periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak. Izvorna smjernica za test probira 421 donesena je 1995. na temelju protokola za preliminarni test probira za reproduktivnu toksičnost o kojem se raspravljalo na dva sastanka stručnjaka u Londonu 1990. (1.) i Tokiju 1992. (2.).
2. Ova je ispitna metoda ažurirana relevantnim krajnjim učincima endokrinih ometača, kao nastavno djelovanje na aktivnost visokog prioriteta koju je OECD pokrenuo 1998. kako bi revidirao postojeće smjernice za ispitivanje i razvio nove smjernice za probir i ispitivanje potencijalnih endokrinih ometača (3.). Na primjer, Smjernica OECD-a za ispitivanje 407 (28-dnevno ispitivanje oralne toksičnosti na glodavcima uz primjenu ponovljenih doza, poglavlje B.7. ovog Priloga) poboljšana je 2008. parametrima koji su primjereni za otkrivanje endokrine aktivnosti ispitivanih kemikalija. Ažuriranjem Smjernice za ispitivanje 421 nastojalo se uključiti određene relevantne krajnje učinke endokrinih ometača u ispitne smjernice za probir ako razdoblja izlaganja obuhvaćaju neka od osjetljivih razdoblja tijekom razvoja (prenatalna razdoblja ili rana postnatalna razdoblja).
3. Odabrani dodatni relevantni krajnji učinci endokrinih ometača, koji su i dio Smjernice za ispitivanje 443 (produljena studija reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji, poglavlje B.56. ovog Priloga), uključeni su u Smjernicu za ispitivanje 421 na temelju studije izvedivosti koja se bavi znanstvenim i tehničkim pitanjima povezanim s njihovim uključivanjem te mogućim prilagodbama plana ispitivanja koje su potrebne za njihovo uključivanje (4.).
4. Ova je ispitna metoda osmišljena za dobivanje ograničenih informacija o učincima ispitivane kemikalije na reproduktivnost mužjaka i ženki kao što su funkcija gonada, ponašanje kod parenja, začeće, razvoj zametka i parturicija. Ona nije alternativa i ne zamjenjuje postojeće ispitne metode B.31., B.34., B.35. ili B.56.

POČETNA RAZMATRANJA

5. Ova se ispitna metoda za probir može upotrebljavati za dobivanje početnih informacija o mogućim učincima na reprodukciju i/ili razvoj, u ranoj fazi procjene toksikoloških svojstava kemikalija ili za zabrinjavajuće kemikalije. Može se upotrebljavati i kao dio testova početnog probira za postojeće kemikalije za koje je dostupno malo ili nimalo toksikoloških informacija, kao istraživanje o utvrđivanju raspona doze za opsežnije reproduktivne/razvojne studije ili ako se smatra relevantnom iz drugih razloga. Pri provođenju istraživanja treba slijediti opća načela i razmatranja navedena u OECD-ovoj Smjernici br. 19 o priznavanju, procjeni i korištenju kliničkih znakova kao humanih krajnjih točaka za pokusne životinje koje se upotrebljavaju u ocjenama sigurnosti (5.).
6. Ovom se ispitnom metodom ne dobivaju potpune informacije o svim aspektima reprodukcije i razvoja. Točnije, metoda pruža samo ograničena sredstva za otkrivanje postnatalnih manifestacija prenatalnog izlaganja ili učinaka koji se mogu inducirati tijekom postnatalnog izlaganja. Zbog (među ostalim) relativno malog broja životinja u skupinama koje primaju dozu, selektivnosti krajnjih učinaka i kratkog trajanja istraživanja ovom metodom neće se dobiti dokazi za konačne tvrdnje o nepostojanju učinaka. Osim toga, ako ne postoje podaci iz drugih ispitivanja reproduktivne/razvojne toksičnosti, pozitivni rezultati korisni su za početnu procjenu opasnosti i pridonose odlukama u pogledu potrebe za dodatnim ispitivanjem i njegova vremenskog okvira.
7. Rezultate dobivene parametrima povezanim s endokrinim sustavom treba promatrati u kontekstu „OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija” (6.). U tom konceptualnom okviru poboljšana Smjernica OECD-a za ispitivanje 421 nalazi se na razini 4. kao *in vivo* test i pruža podatke o štetnim učincima na relevantne endokrine krajnje točke. Međutim, endokrini signal ne mora se sam po sebi smatrati dovoljnim dokazom da je ispitivana kemikalija endokrini ometač.
8. U ovoj ispitnoj metodi pretpostavlja se oralna primjena ispitivane kemikalije. Ako se upotrebljavaju drugi načini izlaganja, mogu biti potrebne prilagodbe.

9. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.
10. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

11. Ispitivana kemikalija primjenjuje se u gradiranim dozama na nekoliko skupina mužjaka i ženki. Na mužjake treba primjenjivati dozu najmanje četiri tjedna te do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja (to uključuje najmanje dva tjedna prije parenja, tijekom razdoblja parenja i približno dva tjedna poslije parenja). S obzirom na ograničeno razdoblje doziranja prije parenja u mužjaka, plodnost možda neće biti osobito osjetljiv pokazatelj testikularne toksičnosti. Stoga je od ključne važnosti podroban histološki pregled sjemenika. Kombinacija razdoblja doziranja prije parenja od dva tjedna i naknadno promatranje parenja/plodnosti s ukupnim razdobljem doziranja od najmanje četiri tjedna, nakon čega slijedi detaljna histopatologija muških gonada smatraju se dovoljnim da bi se omogućilo otkrivanje većine učinaka na plodnost mužjaka i spermatogenezu.
12. Ženkama dozu treba davati tijekom cijelog istraživanja. To uključuje dva tjedna prije parenja (pri čemu je cilj obuhvatiti najmanje dva cijela ciklusa estrusa), promjenjivo vrijeme do začeća, trajanje graviditeta i najmanje 13 dana nakon okota, do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja.
13. Trajanje istraživanja, nakon aklimatizacije i procjene ciklusa estrusa prije doziranja, ovisi o ponašanju ženki i iznosi približno 63 dana [najmanje 14 dana prije parenja, (do) 14 dana parenja, 22 dana gestacije, 13 dana laktacije].
14. Tijekom razdoblja primjene životinje se svakodnevno pažljivo promatraju radi uočavanja znakova toksičnosti. Životinje koje uginu ili su usmrćene tijekom razdoblja ispitivanja podvrgavaju se obdukciji, a na kraju ispitivanja preživjele se životinje usmrćuju i podvrgavaju obdukciji.

OPIS METODE

Odabir životinjske vrste

15. Ova ispitna metoda osmišljena je za upotrebu na štakorima. Ako se parametri navedeni u ovoj ispitnoj metodi istražuju na drugoj vrsti glodavaca, treba pružiti detaljno obrazloženje. U međunarodnom validacijskom programu za određivanje endokrinih ometača u Smjernici OECD-a za ispitivanje 407 (koja odgovara poglavlju B.7. ovog Priloga) primjenjivali su se samo štakori. Sojeve slabe plodnosti ili poznate po velikoj učestalosti razvojnih defekata ne bi trebalo koristiti. Treba koristiti zdrave životinje koje se prethodno nisu parile i nisu sudjelovale u pokusima. Ispitne životinje treba opisati u pogledu vrste, soja, spola, mase i dobi. Na početku istraživanja razlike u tjelesnoj masi korištenih životinja trebale bi biti minimalne i ne bi trebale prelaziti 20 % srednje vrijednosti tjelesne mase svakog spola. Kad se istraživanje provodi kao preliminarno istraživanje u odnosu na dugotrajno istraživanje ili istraživanje cijele generacije, prednost se daje primjeni životinja istog soja i podrijetla u oba istraživanja.

Smještaj i hranjenje

16. Svi postupci trebaju biti usklađeni s lokalnim standardima brige o životinjama u laboratoriju. Temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 22 °C (± 3 °). Iako bi relativna vlaga trebala biti najmanje 30 %, a poželjno je da ne prelazi 70 %, osim tijekom čišćenja prostorije, cilj bi trebao biti 50–60 %. Rasvjeta treba biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može upotrebljavati konvencionalna laboratorijska hrana uz neograničenu količinu vode za piće. Na izbor prehrane može utjecati potreba da se osigura odgovarajuća mješavina ispitivane kemikalije kad se ona daje na taj način.

17. Životinje trebaju biti smještene u malim skupinama istoga spola; ako je to znanstveno opravdano, životinje se mogu držati u zasebnim nastambama. U slučaju skupnog smještaja, u jednom kavezu ne smije biti smješteno više od pet životinja. Postupci parenja trebali bi se odvijati u kavezima koji odgovaraju toj svrsi. Gravidne ženke treba smjestiti u posebne kaveze i treba im osigurati materijale za izradu gnijezda. Ženke se tijekom laktacije smještaju pojedinačno s njihovom mladunčadi.
18. Treba redovito analizirati ima li u hrani kontaminanata. Uzorak hrane treba sačuvati do kraja izrade izvješća.

Priprema životinja

19. Zdrave, mlade odrasle životinje nasumce se raspoređuju u kontrolne skupine i skupine za tretiranje. Kaveze bi trebalo rasporediti tako da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Životinje se označuju na jedinstven način i drže u kavezima najmanje pet dana prije početka istraživanja kako bi se prilagodile laboratorijskim uvjetima.

Priprema doza

20. Preporučuje se da se ispitivana kemikalija daje oralno osim ako se neki drugi načini primjene smatraju prikladnijima. Ako se odabere oralna primjena, ispitivana kemikalija obično se primjenjuje oralnom intubacijom; međutim, u određenim slučajevima, ispitivane kemikalije mogu se primijeniti i s hranom ili vodom za piće.
21. Prema potrebi, ispitivana se kemikalija otapa ili suspendira u odgovarajućem nosaču. Preporučuje se da se, kad je god moguće, u obzir najprije uzme vodena otopina/suspenzija pa zatim otopina/emulzija u ulju (npr. kukuruzno ulje) te zatim moguća otopina u drugim nosačima. Za nosače koji nisu voda moraju biti poznata toksična svojstva nosača. Treba utvrditi stabilnost i homogenost ispitivane kemikalije u nosaču.

POSTUPAK

Broj i spol životinja

22. Preporučuje se da se u svakoj skupini započne s najmanje deset mužjaka i 12–13 ženki. Ženke će se prije izlaganja procijeniti u pogledu ciklusa estrusa i životinje koje ne pokažu uobičajeni ciklus od četiri do pet dana neće se uključiti u istraživanje; stoga se preporučuje više ženki kako bi se dobilo deset ženki po skupini. Osim u slučaju znatnih toksičnih učinaka, očekuje se da će se tako dobiti najmanje osam gravidnih ženki po skupini, a to je obično najmanji prihvatljivi broj gravidnih ženki po skupini. Cilj je dobiti dovoljno gravidnih životinja i potomaka kako bi se osigurala valjana procjena potencijala ispitivane kemikalije da utječe na plodnost, gravidnost, ponašanje ženki (majki) i potomaka koji sišu te rast i razvoj potomstva F₁ od začeća do 13. dana nakon okota.

Doziranje

23. Općenito, treba upotrijebiti najmanje tri ispitne skupine i jednu kontrolnu skupinu. Visine doze mogu se temeljiti na informacijama iz ispitivanja akutne toksičnosti ili na rezultatima istraživanja s ponovljenim dozama. Osim tretiranja ispitivanom kemikalijom, sa životinjama u kontrolnoj skupini treba postupati na isti način kao sa životinjama iz ispitne skupine. Ako se pri primjeni ispitivane kemikalije koristi nosač, volumen nosača koji primi kontrolna skupina treba biti jednak najvećem upotrijebljenom volumenu.
24. Visine doza treba odabrati uzimajući u obzir sve postojeće podatke o toksičnosti i (toksiko)kinetici koji su dostupni. Treba uzeti u obzir i da je moguća razlika u osjetljivosti između gravidnih ženki i ženki koje nisu gravidne. Najvišu dozu treba odabrati s ciljem induciranja toksičnih učinaka, ali ne i smrti ili velike patnje životinja. Nakon toga treba odabrati slijed postupnog smanjivanja visine doze kako bi se dokazali svi odgovori povezani s doziranjem te da se kod najniže doze ne opažaju štetni učinci (NOAEL). Za određivanje sve nižih doza često su najpogodniji dvostruki do četverostruki intervali, i često je bolje dodati četvrtu ispitnu skupinu nego da između doziranja budu jako veliki intervali (npr. iznad faktora 10).

25. Ako se opaze znakovi opće toksičnosti (npr. smanjena tjelesna masa, učinci na jetri, srcu, plućima ili bubrezima itd.) ili druge promjene koje ne moraju biti toksični odgovori (npr. smanjeno uzimanje hrane, povećanje jetre), uočene učinke na endokrinim krajnjim točkama treba tumačiti s oprezom.

Granični test

26. Ako istraživanje provedeno oralnom primjenom jedne doze od najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase na dan, ili kod davanja doze s hranom ili vodom za piće, primjenom doze koja se u ekvivalentnom postotku daje s hranom ili vodom za piće, u skladu s postupcima opisanima u ovom istraživanju, ne proizvede uočljive toksične učinke i ako na temelju podataka iz strukturno srodnih tvari ne treba očekivati toksičnost, može se smatrati da provođenje potpune studije s nekoliko visina doza nije neophodno. Granični test je relevantan samo ako izloženost ljudi ne ukazuje na potrebu za primjenom veće oralne doze. Za druge vrste primjene doza, kao što su inhalacija ili dermalna primjena, maksimalna koncentracija koja se može postići često je određena fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivanih kemikalija.

Primjena doza

27. Životinjama se svakodnevno daje ispitivana kemikalija sedam dana tjedno. U slučaju primjene oralnom intubacijom ispitivanu kemikaliju treba životinjama dati u jednoj dozi s pomoću želučane sonde ili prikladne intubacijske kanile. Maksimalni volumen tekućine koji se može jednokratno dati ovisi o veličini ispitne životinje. Taj volumen ne smije biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim kad se radi o vodenim otopinama koje dopuštaju primjenu volumena od 2 ml/100 g tjelesne mase. Osim u slučaju nadražujućih ili nagrizajućih ispitivanih kemikalija kod kojih se štetni učinci obično javljaju pri višim koncentracijama, varijabilnost ispitnog volumena treba prilagođavanjem koncentracije svesti na najmanju moguću mjeru kako bi se zajamčio stalni volumen pri svim visinama doza.
28. Kod ispitivane kemikalije koja se primjenjuje s hranom ili vodom za piće važno je osigurati da količine ispitivane kemikalije ne utječu na uravnoteženi unos hrane ili vode. Kad se ispitivana kemikalija daje s hranom, može se koristiti ili stalna koncentracija u odnosu na količinu hrane (ppm) ili stalna visina doze u odnosu na tjelesnu masu životinje; treba navesti iskorištenu opciju. Za ispitivanu kemikaliju koja se primjenjuje oralnom intubacijom, dozu treba davati u podjednako vrijeme ili vremena svakog dana i prilagoditi je najmanje jednom tjedno kako bi se održala stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje.

Plan pokusa

29. Doziranje životinja oba spola trebalo bi započeti najmanje dva tjedna prije parenja, nakon aklimatizacije od najmanje pet dana te nakon što se ženke proberu u pogledu normalnog ciklusa estrusa (u razdoblju od dva tjedna prije tretiranja). Istraživanje treba planirati tako da procjena ciklusa estrusa počne ubrzo nakon što životinje postignu punu spolnu zrelost. To se može malo razlikovati za različite sojeve štakora u različitim laboratorijima, npr. deset tjedana kod štakora soja Sprague Dawley i 12 tjedana kod soja Wistar. Ženke (majke) s potomstvom trebalo bi usmrtiti 13. dana nakon okota ili ubrzo nakon toga. Dan okota (tj. kad se dovrši parturicija) definira se kao nulti dan nakon okota. Ženke koje ne pokazuju znakove kopulacije usmrćuju se 24–26 dana nakon posljednjeg dana razdoblja parenja. Doziranje se nastavlja kod oba spola tijekom razdoblja parenja. Mužjake bi i dalje trebalo dozirati nakon razdoblja parenja barem dok ne istekne ukupno razdoblje doziranja od 28 dana. Zatim se usmrćuju ili se zadržavaju i nastavljaju dozirati radi mogućeg provođenja drugog parenja ako se to smatra primjerenim.
30. Svakodnevno doziranje roditeljskih ženki trebalo bi se nastaviti tijekom cijele gravidnosti i najmanje do 13. dana nakon okota, uključujući i taj dan, ili dan prije usmrćivanja. Kod istraživanja u kojima se ispitivana kemikalija primjenjuje inhalacijom i/ili dermalnim putem doziranje bi se trebalo nastaviti barem do 19. dana gestacije, uključujući i taj dan, i s doziranjem bi se trebalo ponovno početi što prije, a najkasnije na 4. postnatalni dan (PND).
31. Dijagram plana pokusa prikazan je u Dodatku 2.

Postupak parenja

32. U ovom bi se istraživanju obično trebalo upotrebljavati parenje 1:1 (jedan mužjak na jednu ženku). Iznimke se mogu javiti ako dođe do smrti mužjaka. Ženku bi trebalo smjestiti s istim mužjakom dok se ne uoče znakovi kopulacije ili dok ne isteknu dva tjedna. Svako jutro ženke treba pregledati s obzirom na prisutnost sperme ili vaginalnog čepa. Nultim danom graviditeta smatra se dan kad je potvrđeno parenje (pronađen je vaginalni čep ili sperma). Ako je parenje neuspješno, može se razmotriti mogućnost ponovnog parenja ženki s dokazanim mužjacima iste skupine.

Veličina legla

33. Četiri dana nakon okota veličina svakog legla može se prilagoditi nasumičnim selekcijskim uklanjanjem suvišnih mladunaca tako da se po jednom leglu po mogućnosti ostavi četiri ili pet mladunaca svakog spola ovisno o uobičajenoj veličini legla soja štakora koji se upotrebljavaju. Uzorke krvi treba prikupiti od dva dodatna mladunca, objediniti ih i upotrijebiti za određivanje razina seruma T4. Nije prihvatljivo selektivno uklanjanje mladunaca, npr. prema tjelesnoj masi ili anogenitalnom razmaku. Kad je god broj muških ili ženskih mladunaca takav da nije moguće imati četiri ili pet mladunaca svakog spola po leglu, prihvatljivo je djelomično prilagođavanje (npr. šest mužjaka i četiri ženke). Mladunci se ne uklanjaju ako bi se veličina legla time smanjila ispod cilja izdvajanja mladunaca (osam ili deset mladunaca po leglu). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh cilja izdvajanja mladunaca, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.
34. Ako se veličina legla ne prilagođava, 4. dana nakon okota usmrćuju se dva mladunca po leglu i uzimaju se uzorci krvi radi mjerenja koncentracija seruma hormona štitnjače. Ako je moguće, ta dva mladunca po leglu trebale bi biti ženke kako bi se mužjaci sačuvali za procjenu zadržavanja bradavica osim ako uklanjanjem tih mladunaca više ne bi ostalo ženki za procjenu pri završetku ispitivanja. Mladunci se neće uklanjati ako bi se time veličina legla smanjila na manje od osam ili deset mladunaca po leglu (ovisno o uobičajenoj veličini legla kod soja štakora koji se upotrebljava). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh uobičajene veličine legla, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.

Opažanja uživo

Klinička opažanja

35. Tijekom cijelog razdoblja ispitivanja treba provoditi opća klinička opažanja barem jednom dnevno te češće ako se uoče znakovi toksičnosti. Poželjno ih je provoditi u isto vrijeme ili vremena svakog dana vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih učinaka nakon doziranja. Treba zabilježiti značajne promjene ponašanja, znakove otežane ili produljene parturicije i sve znakove toksičnosti, uključujući smrtnost. Te bi bilješke trebale uključivati vrijeme početka, stupanj i trajanje znakova toksičnosti.

Tjelesna masa i unos hrane/vode

36. Mužjake i ženke treba vagati prvog dana primjene doze, a zatim najmanje jednom tjedno i zadnji dan. Tijekom graviditeta ženke bi trebalo vagati 0., 7., 14. i 20. dana te u roku od 24 sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Ta opažanja treba unijeti u izvješće za svaku odraslu životinju posebno.
37. Tijekom razdoblja prije parenja, graviditeta i laktacije unos hrane trebalo bi mjeriti najmanje jednom tjedno. Mjerenje unosa hrane tijekom parenja nije obvezno. Trebalo bi mjeriti i unos vode tijekom tih razdoblja ako se ispitivana kemikalija primjenjuje s vodom za piće.

Ciklusi estrusa

38. Cikluse estrusa trebalo bi pratiti prije početka tretiranja kako bi se za studiju izabrale ženke s uobičajenim ciklusom (vidjeti stavak 22.). Svakodnevno bi se trebali pratiti i vaginalni brisovi od početka razdoblja tretiranja do pojave znakova parenja. Ako postoji zabrinutost u pogledu učinaka akutnog stresa koji bi mogli izmijeniti cikluse estrusa kad se počnu primjenjivati doze, laboratoriji mogu izlagati ispitne životinje dva tjedna, zatim svaki dan prikupiti vaginalne brisove kako bi pratili ciklus estrusa najmanje dva tjedna tijekom razdoblja prije parenja, uz stalno praćenje tijekom razdoblja parenja do pojave znakova parenja. Ako se uzimaju vaginalne/cervikalne stanice, treba paziti da se ne poremeti mukoza jer to može inducirati lažnu trudnoću (7. i 8.).

Parametri potomaka

39. Vrijeme gestacije treba zabilježiti i računati od nultog dana graviditeta. Svako leglo nakon okota treba što prije pregledati kako bi se utvrdio broj i spol mladunaca, mrtvorođenih, živorođenih, patuljastih životinja (mladunci koji su znatno manji od odgovarajućih kontrolnih mladunaca) i prisutnost velikih abnormalnosti.

40. Žive mladunce trebalo bi prebrojati i odrediti njihov spol te bi legla trebalo izvagati u roku od 24 sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Uz opažanja opisana u stavku 35. trebalo bi zabilježiti i svako abnormalno ponašanje potomaka.
41. Treba izmjeriti anogenitalni razmak u svakog mladunca na isti postnatalni dan, od nultog do 4. postnatalnog dana. Tjelesnu masu mladunaca treba utvrditi na dan mjerenja anogenitalnog razmaka, a njega treba normalizirati u odnosu na veličinu mladunca (najbolje kubni korijen tjelesne mase (9.)). Broj bradavica/areola u mužjaka mladunaca trebalo bi utvrditi 12. ili 13. postnatalnog dana, kako se preporučuje u Smjernici OECD-a 151 (10.).

Klinička biokemija

42. Uzorci krvi uzimaju se s utvrđenog mjesta na temelju sljedećeg rasporeda:

- od najmanje dva mladunca po leglu 4. dana nakon okota ako broj mladunaca to omogućuje (vidjeti stavke 33.–34.),
- od svih ženki (majki) i najmanje dva mladunca po leglu pri završetku ispitivanja 13. dana, i
- od svih odraslih mužjaka pri završetku ispitivanja.

Svi uzorci krvi spremaju se u odgovarajućim uvjetima. Uzorci krvi mladunaca i odraslih mužjaka uzeti 13. dana procjenjuju se u pogledu razina seruma hormona štitnjače (T4). Daljnja procjena hormona T4 u uzorcima krvi ženki (majki) i mladunaca uzetih 4. dana obavlja se po potrebi. Moguće je i mjerenje drugih hormona ako je to relevantno. Krv mladunaca može se izvaditi po leglu radi analiza hormona štitnjače. Hormone štitnjače (T4 i TSH) po mogućnosti bi trebalo mjeriti kao „ukupni broj”.

43. Sljedeći čimbenici mogu utjecati na varijabilnost i apsolutne koncentracije za određivanje hormona:

- vrijeme usmrćivanja zbog dnevne varijacije koncentracije hormona,
- metoda usmrćivanja radi izbjegavanja pretjeranog stresa za životinje koji može utjecati na koncentraciju hormona,
- pribori za određivanje hormona koji se mogu razlikovati po njihovim standardnim krivuljama.

44. Uzorke plazme koji su posebno namijenjeni određivanju hormona treba uzeti u usporedivo doba dana. Brojčane vrijednosti dobivene analizom koncentracija hormona razlikuju se ovisno o različitom, komercijalno dostupnom priboru.

Patologija

Makroskopska nekropsija

45. U trenutku usmrćivanja ili u slučaju smrti tijekom istraživanja, odrasle životinje treba makroskopski pregledati radi otkrivanja bilo kakvih abnormalnosti ili patoloških promjena. Posebnu pozornost treba obratiti na organe reproduktivnog sustava. Broj mjesta za implantaciju treba zabilježiti. Vaginalne briševe treba pregledati ujutro na dan nekropsije kako bi se utvrdila faza ciklusa estrusa i omogućila korelacija s histopatologijom jajnika.
46. Sjemenske i sjemenne kanaliće (epididimis) te prostatu i sjemenne mjehuriće s koagulacijskim žlijezdama, kao cjelinu, svih odraslih mužjaka treba po potrebi obrezivanjem osloboditi od svih prijanjajućih tkiva te ih treba izvagati u mokrom stanju što prije nakon seciranja kako bi se spriječilo njihovo sušenje. Osim toga, mase neobaveznih organa mogle bi uključivati kompleks anusnog podizača i bulbokavernoznog mišića, Cowperove žlijezde i glans penisa kod mužjaka te jajnike u paru (mokra masa) i maternicu (uključujući cerviks) kod ženki; ako se uključuju, te bi mase trebalo prikupiti što prije nakon seciranja.
47. Mrtve mladunce i mladunce koje se usmrte 13. dana nakon okota, ili ubrzo nakon toga, trebalo bi pažljivo pregledati kako bi se utvrdile barem vanjske velike abnormalnosti. Posebnu pozornost treba posvetiti vanjskim reproduktivnim genitalijama koje se pregledava kako bi se utvrdili mogući znakovi promijenjenog razvoja. Na 13. bi se dan trebala sačuvati štitnjača jednog muškog i jednog ženskog mladunca po leglu.

48. Treba sačuvati jajnike, sjemenike, sekundarne spolne organe (maternica i cerviks, sjemeni kanalići, prostata, sjemeni mjehurići zajedno s koagulirajućim žlijezdama), štitnjaču i sve organe koji pokazuju makroskopske lezije svih odraslih životinja. Za rutinski pregled sjemenika i sjemenih kanalića ne preporučuje se fiksiranje u formalinu. Za ta je tkiva prihvatljiva metoda upotreba Bouinova fiksativa ili izmijenjenog Davidsonova fiksativa (11.). Vezivna ovojnica može se nježno i plitko punktirati na oba pola organa iglom koja omogućuje brzu penetraciju fiksativa.

Histopatologija

49. Treba obaviti detaljan histološki pregled jajnika, sjemenika i sjemenih kanalića (uz poseban naglasak na faze spermatogeneze i histopatologiju strukture intersticijskih stanica sjemenika) životinja iz skupine koja je primala najveću dozu i iz kontrolne skupine. Po potrebi se mogu pregledati i ostali sačuvani organi, uključujući štitnjaču mladunaca i odraslih životinja. Masa štitnjače može se odrediti nakon fiksacije. Obrezivanje također treba obaviti vrlo pažljivo te samo nakon fiksacije kako bi se izbjeglo oštećenje tkiva. Oštećena tkiva mogu kompromitirati histopatološku analizu. Ispitivanja treba proširiti na životinje iz drugih skupina doziranja ako su u skupini s najvećom dozom uočene promjene. Smjernice o histopatologiji (11.) pružaju dodatne detaljne informacije o sekciji, fiksaciji, seciranju i histopatologiji endokrinih tkiva.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

50. Treba navesti podatke za svaku pojedinačnu životinju. Osim toga, sve podatke treba sažeti u obliku tablice, tako da se za svaku ispitnu skupinu navede broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su uginule tijekom ispitivanja ili su usmrćene iz humanih razloga, vrijeme smrti ili humanog usmrćenja, broj plodnih životinja, broj gravidnih ženki, broj životinja koje pokazuju znakove toksičnosti, opis uočenih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme prve pojave, trajanje i ozbiljnost toksičnih učinaka, vrste histopatoloških promjena i sve relevantne podatke o leglu. Format sažetog izvješća u obliku tablice koji se pokazao vrlo korisnim za procjenu reproduktivnog/razvojnog učinka naveden je u Dodatku 3.
51. Zbog ograničenih dimenzija istraživanja, statističke analize kojima se nastoji ispitati važnost rezultata imaju ograničenu vrijednost za mnoge krajnje točke, osobito za reproduktivne krajnje točke. Ako se upotrebljavaju statističke analize, odabrana metoda trebala bi biti primjerena za distribuciju varijable koja se ispituje i treba je odabrati prije početka istraživanja. Statistička analiza anogenitalnog razmaka i zadržavanja bradavica trebala bi se temeljiti na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir učinke na leglo. Ako je primjereno, jedinicu analize čini leglo. Statistička analiza tjelesne mase mladunaca trebala bi se temeljiti na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir veličinu legla. Zbog toga što su skupine male, kao pomoć u tumačenju istraživanja mogu biti korisni podaci iz prijašnjih kontrola (npr. za veličinu legla) ako su dostupni.

Ocjena rezultata

52. Nalaze ovog istraživanja toksičnosti treba ocijeniti s obzirom na uočene učinke, nekropsiju i mikroskopske nalaze. Evaluacija treba obuhvatiti odnos između doze ispitivane kemikalije i prisutnosti ili izostanka, učestalosti i ozbiljnosti abnormalnosti, uključujući makrolezije, identificirane ciljne organe, neplodnost, kliničke abnormalnosti, promjene sposobnosti reprodukcije i legla, promjene tjelesne mase, učinke na smrtnost i sve ostale toksične učinke.
53. Zbog kratkog razdoblja tretiranja mužjaka, pri procjeni učinaka na reprodukciju mužjaka uz podatke o plodnosti trebalo bi razmotriti histopatologiju sjemenika i sjemenih kanalića. Kao pomoć u tumačenju istraživanja može biti korisna i upotreba podataka o prijašnjim kontrolama u vezi s reprodukcijom/razvojem (npr. za veličinu legla, anogenitalni razmak, zadržavanje bradavica, razine seruma T4) ako su dostupni.
54. Radi kontrole kvalitete predlaže se da se prikupljaju podaci o prijašnjim kontrolama te da se izračunaju koeficijenti varijacije za brojčane podatke, posebno za parametre povezane s otkrivanjem endokrinih ometača. Ti se podaci mogu upotrijebiti za uspoređivanje kad se ocjenjuju konkretna istraživanja.

Izvjješće o ispitivanju

55. Izvjješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Nosač (po potrebi):

- obrazloženje odabira nosača ako nije riječ o vodi.

Ispitne životinje:

- korištena vrsta/soj,
- broj, dob i spol životinja,
- podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,
- pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja,
- obrazloženje odabira vrste ako se ne radi o štakorima.

Ispitni uvjeti:

- obrazloženje odabira visine doze,
- pojedinosti o formulaciji ispitivane kemikalije/pripremanju hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost pripravka,
- pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,
- preračunavanje koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu (mg/kg tjelesne težine/dan), prema potrebi,

- pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,
- detaljan opis postupka nasumičnog odabira mladunaca za izdvajanje ako se ono obavlja.

Rezultati:

- tjelesna masa/promjene tjelesne mase,
- unos hrane i unos vode, ako su dostupni,
- podaci o toksičnom odgovoru po spolu i dozi, uključujući plodnost, gestaciju i sve druge znakove toksičnosti,
- duljina gestacije,
- toksični ili drugi učinci na reprodukciju, potomstvo, rast nakon rođenja itd.,
- vrsta, stupanj i trajanje uočenih kliničkih promjena (reverzibilne ili ireverzibilne),
- broj odraslih ženki s normalnim ili abnormalnim ciklusom estrusa i trajanje ciklusa,
- broj živorođenih i gubitaka nakon implantacija,
- podaci o tjelesnoj masi mladunaca,
- anogenitalni razmak svih mladunaca (i tjelesna masa na dan mjerenja anogenitalnog razmaka),
- zadržavanje bradavica kod mužjaka mladunaca,
- razine hormona štitnjače, u mladunaca starih 13 dana i odraslih mužjaka (i u ženki (majki) i mladunaca starih 4 dana ako se mjeri),
- broj mladunaca s jako izraženim abnormalnostima, ukupna procjena vanjskih genitalija, broj patuljastih životinja,
- vrijeme smrti tijekom istraživanja ili je li životinja preživjela do kraja,
- broj implantacija, veličina i masa legla u trenutku evidentiranja,
- tjelesna masa u trenutku usmrćenja i podaci o masi organa za roditeljske životinje,
- nalazi nekropsije,
- iscrpan opis histopatoloških nalaza,

- podaci o apsorpciji (ako su dostupni),
- statistička obrada rezultata, prema potrebi.

Rasprava o rezultatima.

Zaključci.

Tumačenje rezultata

56. Istraživanjem će se pružiti procjene reproduktivne/razvojne toksičnosti povezane s primjenom ponovljenih doza (vidjeti stavke 5. i 6.). Ono bi moglo dati naznaku u vezi s tim treba li provesti daljnja ispitivanjima te daje smjernice za osmišljavanje naknadnih istraživanja. Za pomoć pri tumačenju rezultata u pogledu reprodukcije i razvoja (12.) treba pogledati Smjernicu OECD-a 43. U Smjernici OECD-a br. 106 o histološkoj procjeni endokrinih i reproduktivnih ispitivanja na glodavcima (11.) navedene su informacije o pripremi i procjeni (endokrinih) organa i vaginalnih brisova koje mogu biti korisne za ovu smjernicu za ispitivanje.

LITERATURA

1. OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokio, 27–29. listopada 1992. Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
3. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10. – 11. ožujka 1998. Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
4. OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
5. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
6. OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
7. Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84.–97.
8. Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.
9. Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383.–390.

10. OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
11. OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
12. OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

Dodatak 1.

DEFINICIJE (VIDJETI I SMJERNICU OECD-A 150 (6.))

Androgeni učinak je sposobnost kemikalije da djeluje kao prirodni androgeni hormon (npr. testosteron) u organizmu sisavaca.

Antiandrogeni učinak je sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje prirodnog androgenog hormona (npr. testosterona) u organizmu sisavaca.

Antiestrogeni učinak je sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje prirodnog estrogenog hormona (npr. estradiol 17 β) u organizmu sisavaca.

Antitiroidna aktivnost je sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje prirodnog hormona štitnjače (npr. T₃) u organizmu sisavaca.

Kemikalija je tvar ili smjesa.

Razvojna toksičnost: manifestacija reproduktivne toksičnosti koju čine prenatalni, postnatalni, strukturni ili funkcionalni poremećaji potomstva.

Doziranje je opći pojam koji obuhvaća dozu, njezinu učestalost i trajanje doziranja.

Doza je količina ispitivane kemikalije koja se primjenjuje. Doza se izražava kao masa ispitivane kemikalije po jedinici tjelesne mase ispitne životinje po danu (npr. mg/kg tjelesne mase po danu) ili kao stalna koncentracija u hrani.

Evidentna toksičnost je opći naziv koji opisuje jasne znakove toksičnosti nakon primjene ispitivane kemikalije. Ti bi znakovi trebali biti dovoljni za utvrđivanje opasnosti i trebaju biti takvi da se za primjenu povišene doze može očekivati da će rezultirati razvojem ozbiljnih znakova toksičnosti i mogućom smrtnošću.

Ometanje plodnosti čine poremećaji muških ili ženskih reproduktivnih funkcija ili reproduktivne sposobnosti.

Toksičnost kod majke: štetni učinci na gravidne ženke do kojih dolazi specifično (izravni učinak) ili nespecifično (neizravni učinak).

NOAEL je kratica za visinu doze bez vidljivih štetnih učinaka. To je najviša doza pri kojoj se ne opažaju nikakvi štetni učinci povezani s tretiranjem.

Estrogeni učinak je sposobnost kemikalije da djeluje kao prirodni estrogeni hormon (npr. estradiol 17 β) u organizmu sisavaca.

Reproduktivna toksičnost predstavlja štetne učinke na potomstvo i/ili oštećenje muške i ženske reproduktivne funkcije ili sposobnosti.

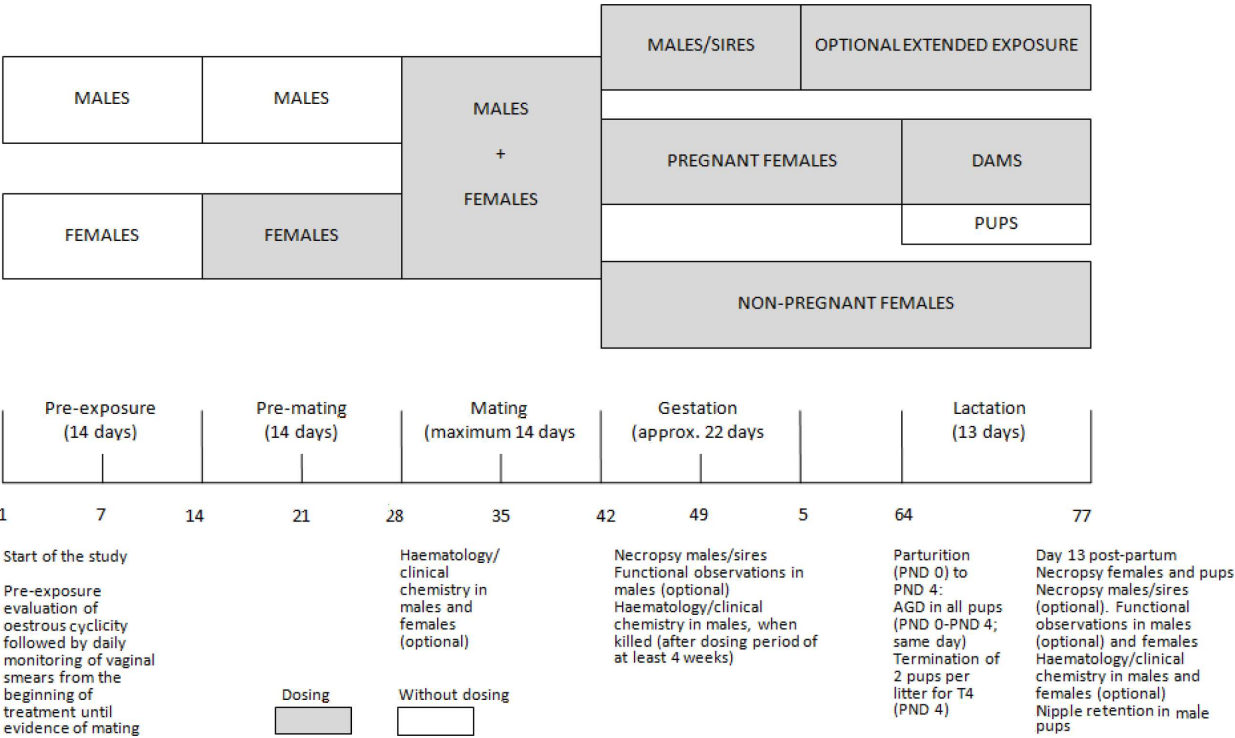
Ispitivana kemikalija je svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Tiroidna aktivnost je sposobnost kemikalije da djeluje kao prirodni hormon štitnjače (npr. T₃) u organizmu sisavaca.

Validacija je znanstveni postupak s ciljem karakterizacije operativnih zahtjeva i ograničenja ispitne metode te pokazivanja njezine pouzdanosti i relevantnosti za određenu svrhu.

Dodatak 2.

DIJAGRAM PLANA POKUSA IZ KOJEG SE VIDI MAKSIMALNO TRAJANJE STUDIJE, NA TEMELJU CIJELOG 14-DNEVNOG RAZDOBLJA PARENJA



Dodatak 3.

SAŽETO IZVJEŠĆE U OBLIKU TABLICE O UČINCIMA NA REPRODUKCIJU/RAZVOJ

OPAŽANJA	VRIJEDNOSTI				
Doziranje (jedinice)	0 (kontrola)	...	...	...	...
Formirani parovi (N)					
Ciklus estrusa (barem srednja vrijednost duljine i učestalost nepravilnih ciklusa)					
Ženke koje pokazuju znakove kopulacije (N)					
Ženke koje su postale gravidne (N)					
Dani začeća 1–5 (N)					
Dani začeća 6–... (!) (N)					
Graviditet ≤ 21 dan (N)					
Graviditet = 22 dana (N)					
Graviditet ≥ 23 dana (N)					
Ženke (majke) sa živim mladuncima (N)					
Ženke (majke) sa živim mladuncima 4. dana nakon okota (N)					
Implantati po ženki (majci) (srednja vrijednost)					
Živi mladunci po ženki (majci) pri okotu (srednja vrijednost)					
Živi mladunci po ženki (majci) 4. dana (srednja vrijednost)					
Omjer spolova (m/ž) pri okotu (srednja vrijednost)					
Omjer spolova (m/ž) 4. dana (srednja vrijednost)					
Masa legla pri okotu (srednja vrijednost)					
Masa legla 4. dana (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca pri okotu (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca u trenutku mjerenja anogenitalnog razmaka (srednja vrijednost za mužjake i srednja vrijednost za ženke)					

OPAŽANJA	VRIJEDNOSTI				
Doziranje (jedinice)	0 (kontrola)	...	...	...	...
Anogenitalni razmak na isti postnatalni dan, dan okota – 4. dan (srednja vrijednost za mužjake i ženke, naznaka postnatalnog dana)					
Masa mladunaca 4. dana (srednja vrijednost)					
Zadržavanje bradavica kod mužjaka mladunaca 13. dana (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca 13. dana (srednja vrijednost)					

ABNORMALNI MLADUNCI

Ženke (majke) s 0					
Ženke (majke) s 1					
Ženke (majke) s ≥ 2					

GUBITAK POTOMAKA**Prenatalno/nakon implantacije (implantacije umanjene za broj živorođenih)**

Ženke s 0					
Ženke s 1					
Ženke s 2					
Ženke s ≥ 3					

Postnatalno (broj živorođenih umanjen za broj živih mladunaca 13. dana nakon okota)

Ženke s 0					
Ženke s 1					
Ženke s 2					
Ženke s ≥ 3					

(1) posljednji dan razdoblja parenja

B.64. KOMBINIRANO ISTRAŽIVANJE TOKSIČNOSTI S PONOVLJENIM DOZAMA S TESTOM PROBIRA ZA REPRODUKTIVNU/RAZVOJNU TOKSIČNOST**UVOD**

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 422 (TG) (2016.). Smjernice OECD-a za ispitivanje kemikalija periodično se preispituju uzimajući u obzir znanstveni napredak. Izvorna smjernica za test probira 422 donesena je 1996. na temelju protokola za kombinirani test s ponovljenim dozama i testa probira za reproduktivnu/razvojnu toksičnost o kojem se raspravljalo na dva sastanka stručnjaka u Londonu 1990. (1.) i Tokiju 1992. (2.).
2. U ovoj se ispitnoj metodi kombinira dio koji se odnosi na probir za reproduktivnu/razvojnu toksičnost, koji se temelji na iskustvu koje su zemlje članice stekle upotrebom izvorne metode o postojećim kemikalijama koje se proizvode u velikim količinama i na temelju istraživačkih ispitivanja s tvarima za pozitivnu kontrolu (3. i 4.), te dio koji se odnosi na toksičnost s ponovljenim dozama, u skladu sa Smjernicom OECD-a za ispitivanje 407 (28-dnevno ispitivanje oralne toksičnosti na glodavcima uz primjenu ponovljenih doza; odgovara poglavlju B.7. ovog Priloga).
3. Ova je ispitna metoda ažurirana relevantnim krajnjim točkama endokrinih ometača, kao nastavno djelovanje na aktivnost visokog prioriteta koju je OECD pokrenuo 1998. kako bi revidirao postojeće smjernice za ispitivanje i razvio nove smjernice za probir i ispitivanje potencijalnih endokrinih ometača (5.). U tom kontekstu Smjernica za ispitivanje 407 (koja odgovara poglavlju B.7. ovog Priloga) poboljšana je 2008. parametrima koji su primjereni za otkrivanje endokrine aktivnosti ispitivanih kemikalija. Ažuriranjem Smjernice za ispitivanje 422 nastojalo se uključiti određene relevantne krajnje točke endokrinih ometača u ispitne smjernice za probir kod kojih razdoblja izlaganja obuhvaćaju neka od osjetljivih razdoblja tijekom razvoja (prenatalna razdoblja ili rana postnatalna razdoblja).
4. Odabrane dodatne relevantne krajnje točke endokrinih ometača, koje su i dio Smjernice za ispitivanje 443 (produljena studija reproduktivne toksičnosti na jednoj generaciji, koja odgovara poglavlju B.56. ovog Priloga), uključeni su u Smjernicu za ispitivanje 422 na temelju studije izvedivosti koja se bavi znanstvenim i tehničkim pitanjima povezanim s njihovim uključivanjem te mogućim prilagodbama plana ispitivanja koje su potrebne za njihovo uključivanje (6.).
5. Ova je ispitna metoda osmišljena za dobivanje ograničenih informacija o učincima ispitivane kemikalije na reproduktivnost mužjaka i ženki, kao što su funkcija gonada, ponašanje kod parenja, začeće, razvoj zametka i parturicija. Ona nije alternativa i ne zamjenjuje postojeće ispitne metode B.31., B.34., B.35. ili B.56.

POČETNA RAZMATRANJA

6. Pri procjeni i ocjenjivanju toksičnih svojstava ispitivane kemikalije određivanje oralne toksičnosti uz primjenu ponavljanih doza može se provesti nakon dobivanja početnih informacija o toksičnosti iz ispitivanja akutne toksičnosti. To istraživanje pruža informacije o mogućim opasnostima po zdravlje do kojih bi moglo doći zbog ponovljenog izlaganja tijekom relativno ograničenog vremenskog razdoblja. Ta metoda obuhvaća osnovno istraživanje toksičnosti s ponovljenim dozama koje se može upotrijebiti za kemikalije za koje nije opravdano 90-dnevno istraživanje (npr. ako proizvedena količina ne prelazi određene granice) ili kao preliminarno istraživanje za dugotrajno istraživanje. Pri provođenju istraživanja treba slijediti osnovna načela i razmatranja navedena u OECD-ovoj Smjernici br. 19 o priznavanju, procjeni i korištenju kliničkih znakova kao humanih krajnjih točaka za pokusne životinje koje se upotrebljavaju u ocjenama sigurnosti (7.).
7. Nadalje, obuhvaća test probira za reproduktivnu/razvojnu toksičnost i stoga se može upotrebljavati i za dobivanje početnih informacija o mogućim učincima na reproduktivnost mužjaka i ženki kao što su funkcija gonada, ponašanje kod parenja, začeće, razvoj zametka i parturicija, u ranoj fazi procjene toksikoloških svojstava ispitivanih kemikalija ili za zabrinjavajuće ispitivane kemikalije. Ovom se ispitnom metodom ne dobivaju potpune informacije o svim aspektima reprodukcije i razvoja. Točnije, metoda pruža samo ograničena sredstva za otkrivanje postnatalnih manifestacija prenatalnog izlaganja ili učinaka koji se mogu inducirati tijekom postnatalnog izlaganja. Zbog (među ostalim) selektivnosti krajnjih točaka i kratkog trajanja istraživanja ovom metodom neće se dobiti dokazi za konačne tvrdnje o nepostojanju reproduktivnih/razvojnih učinaka. Osim toga, ako ne postoje podaci iz drugih ispitivanja reproduktivne/razvojne toksičnosti, pozitivni rezultati korisni su za početnu procjenu opasnosti i pridonose odlukama u pogledu potrebe za dodatnim ispitivanjem i njegova vremenskog okvira.

8. Rezultate dobivene parametrima povezanim s endokrinim sustavom treba promatrati u kontekstu „OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija” (8.). U tom konceptualnom okviru poboljšana Smjernica OECD-a za ispitivanje 422 nalazi se na razini 4. kao *in vivo* test i pruža podatke o štetnim učincima na relevantne endokrine krajnje točke. Međutim, endokrini signal ne mora se sam po sebi smatrati dovoljnim dokazom da je ispitivana kemikalija endokrini ometač.
9. Ova ispitna metoda naglasak stavlja i na neurološke učinke kao specifičnu krajnju točku, a naglašava i potrebu za pozornim kliničkim opažanjem životinja kako bi se dobilo što više informacija. Cilj je ove metode identificirati kemikalije koje imaju neurotoksički potencijal, što može zahtijevati daljnja podrobna istraživanja tog aspekta. Osim toga, metoda može pokazati i osnovne imunološke učinke.
10. Ako ne postoje podaci iz drugih istraživanja sustavne toksičnosti, reproduktivne/razvojne toksičnosti, neurotoksičnosti i/ili imunotoksičnosti, pozitivni rezultati korisni su za početnu procjenu opasnosti i pridonose odlukama u pogledu potrebe za dodatnim ispitivanjem i njegova vremenskog okvira. Ispitivanje može biti osobito korisno kao dio OECD-ova podatkovnog skupa za informacije o probiru (SIDS) za procjenu postojećih kemikalija za koje je dostupno malo ili nimalo toksikoloških informacija i može služiti kao alternativa provođenju dvaju zasebnih ispitivanja toksičnosti s ponovljenim dozama (Smjernica OECD-a za ispitivanje 407, koja odgovara poglavlju B.7. ovog Priloga) odnosno reproduktivne/razvojne toksičnosti (Smjernica OECD-a za ispitivanje 421, koja odgovara poglavlju B.63. ovog Priloga). Može se upotrebljavati i kao istraživanje o utvrđivanju raspona doze za opsežnija reproduktivna/razvojna istraživanja ili ako se smatra relevantnim iz drugih razloga.
11. Općenito se pretpostavlja da postoje razlike u osjetljivosti između gravidnih životinja i onih koje nisu gravidne. Stoga u ovom kombiniranom testu može biti teže odrediti visine doza koje su primjerene i za procjenu opće sustavne toksičnosti i specifične reproduktivne/razvojne toksičnosti nego kod zasebnog provođenja pojedinačnih ispitivanja. Nadalje, tumačenje rezultata ispitivanja u pogledu opće sustavne toksičnosti može biti teže nego kod provođenja zasebnog istraživanja s ponovljenim dozama, osobito ako se serumski i histopatološki parametri ne procjenjuju u isto vrijeme tijekom istraživanja. Zbog te tehničke složenosti za provođenje ovog kombiniranog testa probira potrebno je znatno iskustvo u području ispitivanja toksičnosti. S druge strane, osim manjeg broja životinja koje sudjeluju, kombinirani test može pružiti bolji način za razlikovanje izravnih učinaka na reprodukciju/razvoj od učinaka koji su sekundarni u odnosu na druge (sustavne) učinke.
12. U ovom je ispitivanju razdoblje doziranja dulje nego kod uobičajenog 28-dnevnog istraživanja s ponovljenim dozama. Međutim, upotrebljava se manje životinja svakog spola po skupini u usporedbi sa situacijom u kojoj se uz test probira za reproduktivnu/razvojnu toksičnost provodi uobičajeno 28-dnevno istraživanje s ponovljenim dozama.
13. U ovoj ispitnoj metodi pretpostavlja se oralna primjena ispitivane kemikalije. Ako se upotrebljavaju drugi načini izlaganja, mogu biti potrebne prilagodbe.
14. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.
15. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

NAČELO ISPITIVANJA

16. Ispitivana kemikalija primjenjuje se u gradiranim dozama na nekoliko skupina mužjaka i ženki. Na mužjake treba primjenjivati dozu najmanje četiri tjedna, do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja (to uključuje najmanje dva tjedna prije parenja, tijekom razdoblja parenja i približno dva tjedna poslije parenja). S obzirom na ograničeno razdoblje doziranja prije parenja u mužjaka, plodnost možda neće biti osobito osjetljiv pokazatelj testikularne toksičnosti. Stoga je od ključne važnosti podroban histološki pregled sjemenika. Kombinacija razdoblja

doziranja prije parenja od dva tjedna i naknadno promatranje parenja/plodnosti s ukupnim razdobljem doziranja od najmanje četiri tjedna, nakon čega slijedi detaljna histopatologija muških gonada smatraju se dovoljnima da bi se omogućilo otkrivanje većine učinaka na plodnost mužjaka i spermatogenezu.

17. Ženkama dozu treba davati tijekom cijelog istraživanja. To uključuje dva tjedna prije parenja (pri čemu je cilj obuhvatiti najmanje dva cijela ciklusa estrusa), promjenjivo vrijeme do začeća, trajanje graviditeta i najmanje 13 dana nakon okota, do dana i uključujući dan prije planiranog usmrćivanja.
18. Trajanje istraživanja, nakon aklimatizacije i procjene ciklusa estrusa prije doziranja, ovisi o ponašanju ženki i iznosi približno 63 dana [najmanje 14 dana prije parenja, (do) 14 dana parenja, 22 dana gestacije, 13 dana laktacije].
19. Tijekom razdoblja primjene životinje se svakodnevno pažljivo promatraju radi uočavanja znakova toksičnosti. Životinje koje ugibaju ili su usmrćene tijekom ispitivanja podvrgavaju se obdukciji, a na kraju ispitivanja preživjele se životinje usmrćuju i podvrgavaju obdukciji.

OPIS METODE

Odabir životinjske vrste

20. Ova ispitna metoda osmišljena je za upotrebu na štakorima. Ako se parametri navedeni u ovoj Smjernici za ispitivanje 422 istražuju na drugoj vrsti glodavaca, treba pružiti detaljno obrazloženje. U međunarodnom validacijskom programu za određivanje endokrinih ometača o Smjernici za ispitivanje 407 primjenjivali su se samo štakori. Sojeve slabe plodnosti ili poznate po velikoj učestalosti razvojnih defekata ne bi trebalo koristiti. Treba koristiti zdrave životinje koje se prethodno nisu parile i nisu sudjelovale u pokusima. Ispitne životinje treba opisati u pogledu vrste, soja, spola, mase i dobi. Na početku istraživanja razlike u tjelesnoj masi korištenih životinja trebale bi biti minimalne i ne bi trebale prelaziti $\pm 20\%$ srednje vrijednosti tjelesne mase svakog spola. Ako se istraživanje provodi kao preliminarno istraživanje u odnosu na dugotrajno istraživanje ili istraživanje cijele generacije, prednost se daje primjeni životinja istog soja i podrijetla u oba istraživanja.

Smještaj i hranjenje

21. Svi postupci trebaju biti usklađeni s lokalnim standardima brige o životinjama u laboratoriju. Temperatura u prostoriji u kojoj se drže pokusne životinje treba biti 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). Relativna vlaga trebala bi iznositi najmanje 30 %, a poželjno je da ne prelazi 70 %, osim tijekom čišćenja prostorije. Rasvjeta treba biti umjetna uz izmjenu 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Za hranjenje se može upotrebljavati konvencionalna laboratorijska hrana uz neograničenu količinu vode za piće. Na izbor prehrane može utjecati potreba da se osigura odgovarajuća mješavina ispitivane kemikalije kad se ona daje na taj način.
22. Životinje trebaju biti smještene u malim skupinama istoga spola; ako je to znanstveno opravdano, životinje se mogu držati u zasebnim nastambama. U slučaju skupnog smještaja, u jednom kavezu ne smije biti smješteno više od pet životinja. Postupci parenja trebali bi se odvijati u kavezima koji odgovaraju toj svrsi. Gravidne ženke treba smjestiti u posebne kaveze i treba im osigurati materijale za izradu gnijezda. Ženke se tijekom laktacije smještaju pojedinačno s njihovom mladunčadi.
23. Treba redovito analizirati ima li u hrani kontaminanata. Uzorak hrane treba sačuvati do kraja izrade izvješća.

Priprema životinja

24. Zdrave, mlade odrasle životinje nasumce se odabiru i raspoređuju u skupine za tretiranje i kaveze. Kaveze bi trebalo rasporediti tako da se učinci do kojih bi moglo doći zbog položaja kaveza svedu na minimum. Životinje se označuju na jedinstven način i drže u kavezima najmanje pet dana prije početka istraživanja kako bi se prilagodile laboratorijskim uvjetima.

Priprema doza

25. Preporučuje se da se ispitivana kemikalija daje oralno osim ako se neki drugi načini primjene smatraju prikladnijima. Ako se odabere oralna primjena, ispitivana kemikalija obično se daje oralnom intubacijom; međutim, u određenim slučajevima, ispitivane kemikalije mogu se primijeniti i s hranom ili vodom za piće.

26. Prema potrebi, ispitivana se kemikalija otapa ili suspendira u odgovarajućem nosaču. Kad je god moguće, preporuča se najprije razmotriti mogućnost primjene vodene otopine/suspenzije, zatim mogućnost primjene otopine/suspenzije u ulju (npr. kukuruzno ulje) i tek na kraju mogućnost otapanja u ostalim nosačima. Za nosače bez vodene otopine moraju biti poznata toksična svojstva nosača. Treba utvrditi stabilnost i homogenost ispitivane kemikalije u nosaču.

POSTUPAK

Broj i spol životinja

27. Preporučuje se da se u svakoj skupini započne s najmanje deset mužjaka i 12–13 ženki. Ženke će se prije izlaganja procijeniti u pogledu ciklusa estrusa pa se životinje koje ne pokazuju uobičajeni ciklus od četiri do pet dana neće uključiti u istraživanje; stoga se preporučuje više ženki kako bi se dobilo deset ženki po skupini. Osim u slučaju znatnih toksičnih učinaka, očekuje se da će se tako dobiti najmanje osam gravidnih ženki po skupini, a to je obično najmanji prihvatljivi broj gravidnih ženki po skupini. Cilj je dobiti dovoljno gravidnih životinja i potomaka kako bi se osigurala valjana procjena potencijala ispitivane kemikalije da utječe na plodnost, gravidnost, ponašanje ženki (majki) i potomaka koji sišu te rast i razvoj potomstva F_1 od začeca do 13. dana nakon okota. Ako se planira usmrćivanje životinja u međuvremenu, navedeni broj treba povećati za broj životinja predviđenih za usmrćivanje prije završetka istraživanja. Treba razmotriti mogućnost uključivanja dodatne satelitske skupine od pet životinja svakoga spola u kontrolnu skupinu i skupinu koja će primiti najvišu dozu radi opažanja reverzibilnosti, postojanosti ili zakašnjelog nastupa sustavnih toksičnih učinaka najmanje 14 dana nakon tretiranja. Životinje iz satelitskih skupina neće se pariti i stoga se ne upotrebljavaju za procjenu reproduktivne/razvojne toksičnosti.

Doziranje

28. Općenito, treba upotrijebiti najmanje tri ispitne skupine i jednu kontrolnu skupinu. Ako nisu dostupni prikladni podaci o općoj toksičnosti, može se provesti istraživanje o utvrđivanju raspona (životinje istog soja i podrijetla) kako bi se pomoglo pri određivanju visina doze koje će se primjenjivati. Osim tretiranja ispitivanom kemikalijom, sa životinjama u kontrolnoj skupini treba postupati na isti način kao sa životinjama iz ispitne skupine. Ako se pri primjeni ispitivane kemikalije koristi nosač, volumen nosača koji primi kontrolna skupina treba biti jednak najvećem upotrijebljenom volumenu.
29. Visine doza treba odabrati uzimajući u obzir sve postojeće podatke o toksičnosti i (toksiko)kinetici koji su dostupni. Treba uzeti u obzir i da je moguća razlika u osjetljivosti između gravidnih ženki i ženki koje nisu gravidne. Najvišu dozu treba odabrati s ciljem induciranja toksičnih učinaka, ali ne i smrti ili očite patnje. Nakon toga, treba odabrati slijed postupnog smanjivanja visine doze kako bi se dokazali svi odgovori povezani s doziranjem te da kod najniže doze nema štetnih učinaka. Često je optimalno doze primijeniti u dvostrukim do četverostrukim intervalima te je često bolje dodati i četvrtu ispitnu skupinu nego između primjene doza koristiti veoma velike vremenske intervale (npr. iznad faktora 10).
30. Ako se opaze znakovi opće toksičnosti (npr. smanjena tjelesna masa, učinci na jetri, srcu, plućima ili bubrežima itd.) ili druge promjene koje ne moraju biti toksični odgovori (npr. smanjeno uzimanje hrane, povećanje jetre), uočene učinke na endokrinim krajnjim točkama treba tumačiti s oprezom.

Granični test

31. Ako istraživanje provedeno oralnom primjenom jedne doze od najmanje 1 000 mg/kg tjelesne mase na dan ili, kod davanja doze s hranom, primjenom doze koja se u ekvivalentnom postotku daje s hranom ili vodom za piće (na temelju određivanja tjelesne mase), u skladu s postupcima opisanima za ovo istraživanje, ne proizvede uočljive toksične učinke i ako na temelju podataka iz strukturno srodnih tvari ne treba očekivati toksičnost, može se smatrati da provođenje potpunog istraživanja s nekoliko visina doza nije neophodno. Granični test je relevantan samo ako izloženost ljudi ne ukazuje na potrebu za primjenom veće doze. Za druge vrste primjene doza, kao što su inhalacija ili dermalna primjena, maksimalno izlaganje koje se može postići često je određeno fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivanih kemikalija.

Primjena doza

32. Životinjama se svakodnevno daje ispitivana kemikalija sedam dana tjedno. U slučaju primjene oralnom intubacijom ispitivanu kemikaliju treba dati životinjama u jednoj dozi s pomoću želučane sonde ili prikladne intubacijske kanile. Maksimalni volumen tekućine koji se može jednokratno dati ovisi o veličini ispitne životinje. Taj volumen ne smije biti veći od 1 ml/100 g tjelesne mase, osim kad se radi o vodenim otopinama koje dopuštaju primjenu volumena od

2 ml/100 g tjelesne mase. Osim u slučaju nadražujućih ili nagrizajućih ispitivanih kemikalija kod kojih se štetni učinci obično javljaju pri višim koncentracijama, varijabilnost ispitnog volumena treba prilagođavanjem koncentracije svesti na najmanju moguću mjeru kako bi se zajamčio stalni volumen pri svim visinama doza.

33. Kod ispitivanih kemikalija koje se primjenjuju s hranom ili vodom za piće važno je osigurati da količine ispitivane kemikalije ne utječu na uravnoteženi unos hrane ili vode. Kad se ispitivana kemikalija daje s hranom, može se koristiti ili stalna koncentracija u odnosu na količinu hrane (ppm) ili stalna visina doze u odnosu na tjelesnu masu životinje; treba navesti iskorištenu opciju. Za ispitivanu kemikaliju koja se primjenjuje oralnom intubacijom, dozu treba davati u podjednako vrijeme ili vremena svakog dana i prilagoditi je najmanje jednom tjedno kako bi se održala stalna visina doze s obzirom na tjelesnu masu životinje. Kad se prije dugotrajnog ili potpunog istraživanja reproduktivne toksičnosti provodi kombinirano preliminarno istraživanje, u oba istraživanja prehrana životinja treba biti slična.

Plan pokusa

34. Doziranje životinja oba spola trebalo bi započeti dva tjedna prije parenja, nakon aklimatizacije od najmanje pet dana te nakon što se ženke proberu u pogledu normalnog ciklusa estrusa (u razdoblju od dva tjedna prije tretiranja). Istraživanje treba planirati tako da procjena ciklusa estrusa počne ubrzo nakon što životinje postignu punu spolnu zrelost. To se može malo razlikovati za različite sojeve štakora u različitim laboratorijima, npr. deset tjedana kod štakora soja Sprague Dawley i 12 tjedana kod soja Wistar. Ženke (majke) s potomstvom trebalo bi usmrtiti 13. dana nakon okota ili ubrzo nakon toga. Kako bi se omogućio post ženki (majki) preko noći prije uzimanja krvi (ako se prednost daje toj opciji), ženke i njihovi potomci ne moraju se nužno usmrtiti istog dana. Dan okota (tj. kada se dovrši parturicija) definira se kao nulti dan nakon okota. Ženke koje ne pokazuju znakove kopulacije usmrćuju se 24–26 dana nakon posljednjeg dana razdoblja parenja. Doziranje se nastavlja kod oba spola tijekom razdoblja parenja. Mužjake bi i dalje trebalo dozirati nakon razdoblja parenja barem dok ne istekne ukupno razdoblje doziranja od 28 dana. Zatim se usmrćuju ili se zadržavaju i nastavljaju dozirati radi mogućeg provođenja drugog parenja ako se to smatra primjerenim.
35. Svakodnevno doziranje roditeljskih ženki trebalo bi se nastaviti tijekom cijele gravidnosti i najmanje do 13. dana nakon okota, uključujući i taj dan, ili dan prije usmrćivanja. Kod istraživanja u kojima se ispitivana kemikalija primjenjuje inhalacijom i/ili dermalnim putem doziranje bi se trebalo nastaviti barem do 19. dana gestacije, uključujući i taj dan, i s doziranjem bi se trebalo ponovno početi što prije, a najkasnije na 4. postnatalni dan (PND).
36. Životinje u satelitskoj skupini za koje se planira naknadno opažanje, ako su uključene, ne pare se. One se trebaju držati još najmanje 14 dana nakon prvog planiranog usmrćivanja ženki (majki), bez tretiranja, kako bi se otkrili zakašnjeni toksični učinci, postojanost toksičnih učinaka ili oporavak od toksičnih učinaka.
37. Dijagram plana pokusa prikazan je u Dodatku 2.

Ciklusi estrusa

38. Cikluse estrusa trebalo bi pratiti prije početka tretiranja kako bi se za istraživanje odabrale ženke s uobičajenim ciklusom (vidjeti stavak 27.). Svakodnevno bi se trebali pratiti i vaginalni brisovi od početka razdoblja tretiranja do pojave znakova parenja. Ako postoji zabrinutost u pogledu učinaka akutnog stresa koji bi mogli izmijeniti cikluse estrusa kad se počnu primjenjivati doze, laboratoriji mogu izlagati ispitne životinje dva tjedna, zatim svaki dan prikupiti vaginalne brisove kako bi pratili ciklus estrusa najmanje dva tjedna tijekom razdoblja parenja, uz stalno praćenje tijekom razdoblja parenja do pojave znakova parenja. Ako se uzimaju vaginalne/cervikalne stanice, treba paziti da se ne poremeti mukoza, što bi moglo inducirati lažnu trudnoću (8. i 9.).

Postupak parenja

39. U ovom bi se istraživanju obično trebala upotrebljavati parenja 1:1 (jedan mužjak na jednu ženku). Iznimke se mogu javiti ako dođe do smrti mužjaka. Ženku bi trebalo smjestiti s istim mužjakom dok se ne uoče znakovi kopulacije ili dok ne isteknu dva tjedna. Svako jutro ženke treba pregledati u pogledu prisutnosti sperme ili vaginalnog čepa. Nultim danom graviditeta smatra se dan kad je potvrđeno parenje (pronađen je vaginalni čep ili sperma). Ako je parenje bilo neuspješno, može se razmotriti mogućnost ponovnog parenja ženki s dokazanim mužjacima iste skupine.

Veličina legla

40. Četiri dana nakon okota veličina svakog legla može se prilagoditi nasumičnim selekcijskim uklanjanjem suvišnih mladunaca tako da se po jednom leglu po mogućnosti ostavi četiri ili pet mladunaca svakog spola ovisno o uobičajenoj veličini legla soja štakora koji se upotrebljavaju. Uzorke krvi treba prikupiti od dva suvišna mladunca, objediniti ih i upotrijebiti za određivanje razina seruma T4. Nije prihvatljivo selektivno uklanjanje mladunaca, npr. prema tjelesnoj masi ili anogenitalnom razmaku. Kad je god broj muških ili ženskih mladunaca takav da nije moguće imati četiri ili pet mladunaca svakog spola po leglu, prihvatljivo je djelomično prilagođavanje (npr. šest mužjaka i četiri ženke). Mladunci se ne uklanjaju ako bi se veličina legla time smanjila ispod cilja izdvajanja mladunaca (osam ili deset mladunaca po leglu). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh cilja izdvajanja mladunaca, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.
41. Ako se veličina legla ne prilagođava, 4. dana nakon okota usmrćuju se dva mladunca po leglu i uzimaju se uzorci krvi radi mjerenja koncentracija seruma hormona štitnjače. Ako je moguće, ta dva mladunca po leglu trebale bi biti ženke kako bi se mužjaci sačuvali za procjenu zadržavanja bradavica, osim ako uklanjanjem tih mladunaca više ne bi ostalo ženki za procjenu pri završetku ispitivanja. Mladunci se neće uklanjati ako bi se time veličina legla smanjila na manje od osam ili deset mladunaca po leglu (ovisno o uobičajenoj veličini legla kod soja štakora koji se upotrebljava). Ako je dostupan samo jedan mladunac povrh uobičajene veličine legla, uklanja se samo jedan mladunac i od njega se uzima krv za moguću procjenu seruma T4.

Opažanja

42. Opća klinička opažanja treba provoditi najmanje jednom dnevno, po mogućnosti svaki dan u isto vrijeme ili vremena, vodeći računa o razdoblju najvećeg intenziteta očekivanih učinaka nakon doziranja. Zdravstveno stanje životinja treba zabilježiti. Barem dvaput dnevno sve životinje treba pregledati radi otkrivanja mogućih simptoma morbiditeta i smrtnosti.
43. Jednom prije prvog izlaganja i barem jednom tjedno nakon toga treba obaviti detaljno kliničko opažanje stanja svih roditeljskih životinja (to će omogućiti utvrđivanje promjena u stanju istih subjekata). Ta opažanja treba obavljati izvan kaveza u kojima se životinje drže, u standardnom ograđenom prostoru i, po mogućnosti, svaki dan u isto vrijeme. Rezultate opažanja treba pažljivo bilježiti, pri čemu je najbolje koristiti se sustavom ocjenjivanja koji je jasno definirao laboratorij koji obavlja ispitivanje. Treba poduzeti sve što je potrebno kako bi se osiguralo da odstupanja u uvjetima ispitivanja budu minimalna te da opažanja po mogućnosti provode promatrači koji nisu upoznati s tretiranjem. Znakovi koji se bilježe trebaju, među ostalim, uključivati promjene na koži, dlaci, očima, sluznicama, pojavu iscjedaka, izlučine i autonomne aktivnosti (npr. lakrimacija (lučenje suza), piloerekcija, veličina zjenica, nepravilnosti u disanju). Treba zabilježiti i promjene u hodu, držanju i reakcijama na postupanje sa životinjama, kao i pojavu kloničkih ili toničkih pokreta, stereotipije (npr. pretjerano njegovanje krzna, ponavljano kretanje u krug), otežane ili produljene parturicije ili neobičnog ponašanja (npr. samoozljeđivanje, hodanje unatrag) (10).
44. U određenom trenutku tijekom istraživanja treba procijeniti osjetilnu reaktivnost na podražaje raznih vrsta (npr. auditivne, vizualne i proprioceptivne podražaje) (8., 9. i 11.), jakost stiska (12.) i motornu aktivnost (13.) u pet mužjaka i pet ženki nasumično odabranih iz svake skupine. Daljnje pojedinosti o postupcima koji se mogu primjenjivati navedene su u odgovarajućoj referentnoj literaturi. Međutim, mogu se primjenjivati i drugi postupci koji nisu u njoj navedeni. Kod mužjaka bi se ta funkcionalna opažanja trebala provoditi pred kraj razdoblja doziranja, neposredno prije planiranog usmrćivanja, ali prije uzimanja uzoraka krvi za hematologiju ili kliničku kemiju (vidjeti stavke 53.–56., uključujući bilješku 1.). Ženke bi tijekom tih funkcionalnih ispitivanja trebale biti u fiziološki sličnom stanju i po mogućnosti bi ih trebalo ispitati jednom tijekom posljednjeg tjedna laktacije (npr. od 6. do 13. dana laktacije), neposredno prije planiranog usmrćivanja. Vrijeme razdvajanja ženki (majki) i mladunaca trebalo bi se smanjiti u mjeri u kojoj je to moguće.
45. Funkcionalna opažanja koja se obavljaju jednom pred kraj istraživanja mogu se izostaviti ako se istraživanje provodi kao preliminarno istraživanje za naknadno (90-dnevno) istraživanje subkroničnosti ili dugotrajno istraživanje. U tom slučaju funkcionalna opažanja treba uključiti u to sljedeće istraživanje. S druge strane, dostupnost podataka o funkcionalnim opažanjima iz tog istraživanja uz primjenu ponovljenih doza može biti od pomoći u odabiru visina doza u naknadnom istraživanju subkroničnosti ili dugotrajnom istraživanju.
46. U iznimnim slučajevima funkcionalna opažanja mogu izostati i kod skupina koje inače pokazuju simptome toksičnosti do mjere koja bi znatno ometala uspješnost funkcionalnog ispitivanja.
47. Vrijeme gestacije treba zabilježiti i računati od nultog dana graviditeta. Svako leglo nakon okota treba što prije pregledati kako bi se utvrdio broj i spol mladunaca, mrtvorođenih, živorođenih, patuljastih životinja (mladunci koji su znatno manji od odgovarajućih kontrolnih mladunaca) i prisutnost velikih abnormalnosti.
48. Žive mladunce trebalo bi prebrojati i odrediti njihov spol te bi legla trebalo izvagati u roku od 24 sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Uz opažanja roditeljskih životinja (vidjeti stavke 43. i 44.) trebalo bi zabilježiti i svako abnormalno ponašanje potomaka.

49. Treba izmjeriti anogenitalni razmak u svakog mladunca na isti postnatalni dan, od nultog do 4. postnatalnog dana. Tjelesnu masu mladunaca treba utvrditi na dan mjerenja anogenitalnog razmaka, a njega treba normalizirati u odnosu na veličinu mladunca (najbolje kubni korijen tjelesne mase (14.)). Broj bradavica/areola u mužjaka mladunaca trebalo bi utvrditi 12. ili 13. postnatalnog dana, kako se preporučuje u Smjernici OECD-a 151 (15.).

Tjelesna masa i unos hrane/vode

50. Mužjake i ženke treba vagati prvog dana primjene doze, a zatim najmanje jednom tjedno i zadnji dan. Tijekom graviditeta ženke bi trebalo vagati 0., 7., 14. i 20. dana te u roku od 24 sata od parturicije (0. ili 1. dan nakon okota) te barem 4. i 13. dana nakon okota. Ta opažanja treba unijeti u izvješće za svaku odraslu životinju posebno.
51. Tijekom razdoblja prije parenja, graviditeta i laktacije unos hrane trebalo bi mjeriti najmanje jednom tjedno. Mjerenje unosa hrane tijekom parenja nije obvezno. Trebalo bi mjeriti i unos vode tijekom tih razdoblja ako se ispitivana kemikalija primjenjuje tim putem.

Hematologija

52. Na pet mužjaka i pet ženki koji se nasumično odaberu iz svake skupine trebalo bi jednom tijekom istraživanja provesti sljedeće hematološke preglede: hematokrit, koncentracija hemoglobina, broj eritrocita, retikulociti, ukupni i diferencijalni broj leukocita, broj trombocita i mjerenje vremena/potencijala zgrušavanja krvi. Ostala određivanja koja treba provesti ako ispitivana kemikalija ili njezini navodni metaboliti imaju ili se sumnja da imaju oksidacijska svojstva obuhvaćaju koncentraciju methemoglobina i Heinzova tjelešca.
53. Uzorke krvi treba uzeti na specifičanom mjestu. Ženke bi tijekom uzimanja uzoraka trebale biti u fiziološki sličnom stanju. Kako bi se izbjegle praktične poteškoće povezane s varijabilnosti početka gestacije, krv se kod ženki može uzimati na kraju razdoblja prije parenja kao alternativa uzimanju uzoraka neposredno prije ili kao dio postupka za eutanaziju životinja. Uzorke krvi mužjaka po mogućnosti bi trebalo uzimati neposredno prije ili kao dio postupka za eutanaziju životinja. Kao alternativa, krv se kod mužjaka može uzimati i na kraju razdoblja prije parenja ako je tom vremenu uzorkovanja dana prednost kod ženki.
54. Uzorke krvi trebalo bi pohraniti u primjerenim uvjetima.

Klinička biokemija

55. Kliničko-biokemijske pretrage za istraživanje glavnih toksičnih učinaka u tkivima i posebno učinaka na bubrege i jetru treba obaviti na uzorcima krvi dobivenima od pet mužjaka i pet ženki odabranih iz svake skupine. Preporučuje se da životinje tijekom noći pred uzimanje uzoraka krvi poste ⁽¹⁾. Pretrage koje se rade na plazmi ili serumu trebale bi obuhvatiti mjerenje natrija, kalija, glukoze, ukupne količine kolesterola, ureje, kreatinina, ukupne količine proteina i albumina te najmanje dva enzima koji su pokazatelji hepatocelularnih učinaka (kao što su alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza i sorbitol dehidrogenaza) te žučne kiseline. Mjerenja dodatnih enzima (jetrenog ili drugog podrijetla) i bilirubina mogu u određenim okolnostima pružiti korisne informacije.
56. Uzorci krvi uzimaju se s utvrđenog mjesta na temelju sljedećeg rasporeda:
- od najmanje dva mladunca po leglu 4. dana nakon okota ako broj mladunaca to omogućuje (vidjeti stavke 40.–41.),
 - od svih ženki (majki) i najmanje dva mladunaca po leglu pri završetku ispitivanja 13. dana, i
 - od svih odraslih mužjaka pri završetku ispitivanja.

Svi uzorci krvi spremaju se u odgovarajućim uvjetima. Uzorci krvi mladunaca i odraslih mužjaka uzeti 13. dana procjenjuju se u pogledu razina seruma hormona štitnjače (T4). Daljnja procjena hormona T4 u uzorcima krvi ženki (majki) i mladunaca uzetih 4. dana obavlja se po potrebi. Moguće je i mjerenje drugih hormona ako je to relevantno. Krv mladunaca može se izvaditi po leglu radi analiza hormona štitnjače. Hormone štitnjače (T4 i TSH) po mogućnosti bi trebalo mjeriti kao „ukupni broj”.

⁽¹⁾ Post tijekom noći preporučuje se za niz mjerenja u serumu i plazmi, a najviše za glukozu. Glavni je razlog tome činjenica da bi povećana varijabilnost, do koje bi neizbježno došlo u slučaju da se životinjama hrana ne uskrati, vjerojatno prikrila suptilnije učinke i otežala tumačenje rezultata. S druge pak strane, post preko noći može utjecati na opći metabolizam (gravidnih) životinja, ometati laktaciju i ponašanje tijekom dojenja, a posebno u studijama o hranjenju moglo bi ometati dnevno izlaganje ispitivanoj kemikaliji. Ako se primjenjuje post preko noći, klinička biokemijska određivanja u mužjaka treba obaviti nakon provođenja funkcionalnih opažanja u 4. tjednu istraživanja. Ženke bi trebalo zadržati još jedan dan nakon uklanjanja mladunaca (npr. 13. postnatalnog dana). Ženke bi trebale postiti tijekom noći od laktacijskog dana 13.–14. te se posljednji uzorak krvi upotrebljava za kliničko-kemijske parametre.

57. U zadnjem tjednu istraživanja, po izboru, mogu se obaviti analize urina pet nasumično odabranih mužjaka iz svake skupine dobivenog prikupljanjem u određenim vremenskim razmacima: izgled, količina, osmolalnost ili specifična težina, pH, protein, glukoza i krv/krvne stanice.
58. Osim toga, treba razmisliti i o ispitivanju serumskih markera koji označavaju opće oštećenja tkiva. Ostale pretrage, koje bi trebalo obaviti ako poznata svojstva ispitivane kemikalije mogu ili se sumnja da bi mogla utjecati na povezane metaboličke profile uključuju utvrđivanje razine kalcija, fosfata, triglicerida natašte, glukoze natašte, razine specifičnih hormona, methemoglobina i aktivnosti kolinesteraze. Njih treba identificirati od slučaja do slučaja.
59. Sljedeći čimbenici mogu utjecati na varijabilnost i apsolutne koncentracije za određivanje hormona:
- vrijeme usmrćivanja zbog dnevne varijacije koncentracije hormona,
 - metoda usmrćivanja radi izbjegavanja pretjeranog stresa za životinje koji može utjecati na koncentraciju hormona,
 - pribori za određivanje hormona koji se mogu razlikovati po njihovim standardnim krivuljama.
60. Uzorke plazme koji su posebno namijenjeni određivanju hormona treba uzeti u usporedivo doba dana. Brojčane vrijednosti dobivene analizom koncentracija hormona razlikuju se ovisno o različitom, komercijalno dostupnom priboru.
61. Ako su prijašnji polazni podaci neprikladni, u obzir treba uzeti određivanje hematoloških i kliničkih biokemijskih varijabli prije početka doziranja ili po mogućnosti na skupini životinja koje nisu uključene u pokusne skupine. Kod ženki se podaci moraju dobiti od životinja koje doje.

PATOLOGIJA

Makroskopska nekropsija

62. Sve odrasle životinje korištene u istraživanju trebale bi se podvrgnuti kompletnoj, detaljnoj makroskopskoj nekropsiji koja obuhvaća pažljiv pregled vanjske površine tijela, svih otvora te lubanjske, prsne i trbušne šupljine i njihova sadržaja. Posebnu pozornost treba obratiti na organe reproduktivnog sustava. Broj mjesta za implantaciju treba zabilježiti. Vaginalne briseve treba pregledati na dan nekropsije kako bi se utvrdila faza ciklusa estrusa i omogućila korelacija s histopatologijom ženskih reproduktivnih organa.
63. Sjemenske i sjemenske kanaliće te prostatu i sjemenske mjehuriće s koagulacijskim žlijezdama, kao cjelinu, svih odraslih mužjaka treba po potrebi obrezivanjem osloboditi od svih prijanjajućih tkiva te ih treba izvagati u mokrom stanju što prije nakon seciranja kako bi se spriječilo njihovo sušenje. Osim toga, mase neobaveznih organa mogle bi uključivati kompleks anusnog podizača i bulbokavernoznog mišića, Cowperove žlijezde i glans penisa kod mužjaka te jajnike u paru (mokra masa) i maternicu (uključujući cerviks) kod ženki; ako se uključuju, te bi mase trebalo prikupiti što prije nakon seciranja. Treba sačuvati jajnike, sjemenike, sjemenske kanaliće, sekundarne spolne organe i sve organe koji pokazuju makroskopske lezije svih odraslih životinja.
64. Štitnjača svih odraslih mužjaka i ženki te jednog mužjaka i jedne ženke starih 13 dana iz svakog legla trebala bi se sačuvati u najprimjerenijem sredstvu za fiksiranje radi planiranog kasnijeg histopatološkog pregleda. Masa štitnjače može se odrediti nakon fiksacije. Obrezivanje također treba obaviti vrlo pažljivo te samo nakon fiksacije kako bi se izbjeglo oštećenje tkiva. Oštećena tkiva mogu kompromitirati histopatološku analizu. Uzorke krvi treba uzeti na specifičanom mjestu i pohraniti u odgovarajućim uvjetima neposredno prije ili kao dio postupka za eutanaziju životinja (vidjeti stavak 56.).
65. Osim toga, kod najmanje pet odraslih mužjaka i ženki nasumično odabranih iz svake skupine (osim onih za koje je utvrđeno da su na umoru i/ili su eutanazirani prije kraja istraživanja) s jetre, bubrega, nadbubrežnih žlijezda, timusa, slezene, mozga i srca treba obrezati sve prijanjajuće tkivo, prema potrebi, te ih još mokre izvagati što prije nakon seciranja kako bi se spriječilo da se osuše. Sljedeća tkiva treba sačuvati u sredstvu za fiksiranje koje je najprimjerenije i za vrstu tkiva i za planirani kasniji histopatološki pregled: sve makrolezije, mozak (reprezentativne regije uključujući veliki mozak, mali mozak i medulu/most), leđnu moždinu, oko, želudac, tanko i debelo crijevo (uključujući Peyerove ploče), jetru, bubrege, nadbubrežne žlijezde, slezenu, srce, timus, dušnik i pluća (preparirane upuhivanjem fiksativa i zatim uranjanjem), spolne žlijezde (sjemenike i jajnike), sekundarne spolne organe (maternicu i cerviks, sjemenske

kanaliće, prostatu, sjemene mjehuriće s koagulacijskim žlijezdama), vaginu, mokraćni mjehur, limfne čvorove (osim najbližeg drenažnog čvora treba uzeti još jedan limfni čvor na temelju laboratorijskog iskustva (16.)), periferni živac (ishijadični ili tibijalni) po mogućnosti smješten uz mišić, skeletni mišić i kost, s leđnom moždinom (sekcija ili, kao alternativna, svježe pripremljen aspirat koštane srži). Preporučuje se da se sjemenici fiksiraju uranjanjem u Bouinov ili izmijenjeni Davidsonov fiksativ (16., 17. i 18.); za ta se tkiva ne preporučuje fiksacija u formalinu. Vezivna ovojnica može se nježno i plitko punktirati na oba pola organa iglom koja omogućuje brzu penetraciju fiksativa. Klinički i drugi nalazi mogu ukazati na potrebu za ispitivanjem dodatnih tkiva. Treba sačuvati i sve organe za koje se na temelju saznanja o svojstvima ispitivane kemikalije smatra da bi mogli biti ciljni.

66. Sljedeća tkiva mogu dati dragocjenu indikaciju za učinke na endokrini sustav: spolne žlijezde (jajnici i sjemenici), sekundarni spolni organi (maternica s cerviksom, sjemeni kanalići, sjemeni mjehurići s koagulacijskim žlijezdama, dorzolateralna i ventralna prostata), vagina, hipofiza, muška mliječna žlijezda i nadbubrežna žlijezda. Promjene u muškim mliječnim žlijezdama nisu dovoljno dokumentirane, ali taj parametar može biti vrlo osjetljiv na tvari s estrogenskim djelovanjem. Opažanja organa/tkiva koja nisu navedena u stavku 65. nisu obvezna.
67. Mrtve mladunce i mladunce koje se usmrti 13. dana nakon okota, ili ubrzo nakon toga, trebalo bi pažljivo pregledati kako bi se utvrdile barem vanjske velike abnormalnosti. Posebnu pozornost treba posvetiti vanjskim reproduktivnim genitalijama koje se pregledava kako bi se utvrdili mogući znakovi promijenjenog razvoja.

Histopatologija

68. Na sačuvanim organima i tkivima odabranih životinja iz kontrolne skupine i skupina tretiranih visokim dozama treba napraviti kompletan histopatološki pregled (uz poseban naglasak na faze spermatogeneze kod muških spolnih žlijezdi i histopatologiju strukture intersticijskih stanica sjemenika). Po potrebi se mogu pregledati štitnjače mladunaca i preostalih odraslih životinja. Ta ispitivanja treba proširiti na životinje drugih skupina doziranja ako su u skupini s visokom dozom uočene promjene povezane s tretiranjem. Smjernica o histopatologiji (10.) pruža dodatne detaljne informacije o sekciji, fiksaciji, seciranju i histopatologiji endokrinih tkiva.
69. Treba pregledati sve makrolezije. Kako bi se pomoglo pojasniti NOAEL-e, treba pregledati ciljne organe kod skupina tretiranih ostalim dozama, osobito u skupinama kod kojih se tvrdi da pokazuju NOAEL.
70. Ako se koristi satelitska skupina, treba napraviti histopatološki pregled tkiva i organa kod kojih su u tretiranim skupinama uočeni učinci.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

71. Treba navesti podatke za svaku pojedinačnu životinju. Osim toga, sve podatke treba sažeti u obliku tablice, tako da se za svaku ispitnu skupinu navede broj životinja na početku ispitivanja, broj životinja koje su uginule tijekom ispitivanja ili su eutanazirane iz humanih razloga, vrijeme smrti ili eutanazije, broj plodnih životinja, broj gravidnih ženki, broj životinja koje pokazuju znakove toksičnosti, opis uočenih znakova toksičnosti, uključujući vrijeme pojavljivanja, trajanje i ozbiljnost toksičnih učinaka, vrste histopatoloških promjena i sve relevantne podatke o leglu. Format sažetog izvješća u obliku tablice koji se pokazao vrlo korisnim za procjenu reproduktivnih/razvojnih učinaka naveden je u Dodatku 3.
72. Ako je moguće, brojčane rezultate treba ocijeniti odgovarajućom i opće prihvaćenom statističkom metodom. Za usporedbe učinaka unutar raspona visina doza trebala bi se izbjeći uporaba višestrukih t-testova. Statističke metode treba odabrati u fazi planiranja istraživanja. Statistička analiza anogenitalnog razmaka i zadržavanja bradavica trebala bi se temeljiti na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir učinke na leglo. Ako je primjereno, jedinicu analize čini leglo. Statistička analiza tjelesne mase mladunaca trebala bi se temeljiti na podacima za pojedinačne mladunce, uzimajući u obzir veličinu legla. Zbog ograničenih dimenzija istraživanja, statističke analize kojima se nastoji ispitati važnost rezultata imaju ograničenu vrijednost za mnoge krajnje točke, osobito za reproduktivne krajnje točke. Nisu primjerene neke od često korištenih metoda, osobito parametrijska ispitivanja za mjerenje središnje tendencije. Ako se upotrebljavaju statističke analize, odabrana metoda trebala bi biti primjerena za distribuciju varijable koja se ispituje te je treba odabrati prije početka istraživanja.

Ocjena rezultata

73. Nalaze ovog istraživanja toksičnosti treba ocijeniti s obzirom na uočene učinke, nekropsiju i mikroskopske nalaze. Evaluacija treba obuhvatiti odnos između doze ispitivane kemikalije i prisutnosti ili izostanka, učestalosti i ozbiljnosti abnormalnosti, uključujući makrolezije, identificirane ciljne organe, neplodnost, kliničke abnormalnosti, promjene sposobnosti reprodukcije i legla, promjene tjelesne mase, učinke na smrtnost i sve ostale toksične učinke.
74. Zbog kratkog razdoblja tretiranja mužjaka, uz podatke o plodnosti trebalo bi razmotriti i histopatologiju sjemenika i sjemenih kanalića pri procjeni učinaka na reprodukciju mužjaka. Kao pomoć u tumačenju istraživanja može biti korisna i upotreba podataka o prijašnjim kontrolama u pogledu reprodukcije/razvoja (npr. za veličinu legla, anogenitalni razmak, zadržavanje bradavica, razine seruma T4), ako su dostupni.
75. Radi kontrole kvalitete predlaže se prikupljanje podataka o prijašnjim kontrolama te izračunavanje koeficijenata varijacije za brojčane podatke, posebno za parametre povezane s otkrivanjem endokrinih ometača. Ti se podaci mogu upotrijebiti za uspoređivanje kad se ocjenjuju konkretna istraživanja.

Izvješće o ispitivanju

76. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Nosač (po potrebi):

- obrazloženje odabira nosača ako nije riječ o vodi.

Ispitne životinje:

- korištena vrsta/soj,
- broj, dob i spol životinja,
- podrijetlo, uvjeti smještaja, prehrana itd.,
- pojedinačna tjelesna masa životinja na početku ispitivanja,

- obrazloženje odabira vrste ako se ne radi o štakorima.

Ispitni uvjeti:

- obrazloženje odabira visine doze,
- pojedinosti o formulaciji ispitivane kemikalije/pripremanju hrane, postignuta koncentracija, stabilnost i homogenost pripravka,
- pojedinosti o primjeni ispitivane kemikalije,
- preračunavanje koncentracije ispitivane kemikalije u hrani/vodi za piće (ppm) u stvarnu dozu (mg/kg tjelesne težine/dan), prema potrebi,
- pojedinosti o kvaliteti hrane i vode,
- detaljan opis postupka nasumičnog odabira mladunaca za izdvajanje ako se ono obavlja.

Rezultati:

- tjelesna masa/promjene tjelesne mase,
- unos hrane i unos vode, po potrebi,
- podaci o toksičnom odgovoru po spolu i dozi, uključujući plodnost, gestaciju i sve druge znakove
- toksičnosti,
- duljina gestacije, toksični ili drugi učinci na reprodukciju, potomstvo, rast nakon rođenja itd.,
- vrsta, stupanj i trajanje uočenih kliničkih promjena (reverzibilne ili ireverzibilne),
- ocjena osjetilne aktivnosti, jakosti stiska i motorne aktivnosti,
- hematološka ispitivanja s odgovarajućim referentnim vrijednostima,
- klinička biokemijska ispitivanja s odgovarajućim referentnim vrijednostima,
- broj odraslih ženki s normalnim ili abnormalnim ciklusom estrusa i trajanje ciklusa,
- broj živorođenih i gubitaka nakon implantacije,
- broj mladunaca s jako izraženim abnormalnostima, ukupna procjena vanjskih genitalija, broj patuljastih životinja,
- vrijeme smrti tijekom istraživanja ili je li životinja preživjela do kraja,

- broj implantacija, veličina i masa legla u trenutku evidentiranja,
- podaci o tjelesnoj masi mladunaca,
- anogenitalni razmak svih mladunaca (i tjelesna masa na dan mjerenja anogenitalnog razmaka),
- zadržavanje bradavica kod mužjaka mladunaca,
- razine hormona štitnjače, u mladunaca starih 13 dana i odraslih mužjaka (te u ženki (majki) i mladunaca starih 4 dana ako se mjeri),
- tjelesna masa u trenutku usmrćenja i podaci o masi organa za roditeljske životinje,
- nalazi nekropsije,
- iscrpan opis histopatoloških nalaza,
- podaci o apsorpciji (ako su dostupni),
- statistička obrada rezultata, prema potrebi.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

Tumačenje rezultata

77. U ovom će se istraživanju pružiti procjene reproduktivne/razvojne toksičnosti povezane s primjenom ponovljenih doza. Točnije, s obzirom na to da je naglasak stavljen i na opću toksičnost i na krajnje točke reproduktivne/razvojne toksičnosti, rezultati istraživanja omogućit će razlikovanje reproduktivnih/razvojnih učinaka koji se javljaju kad nema opće toksičnosti i onih koji se javljaju samo kod doza koje su toksične i za roditeljske životinje (vidjeti stavke 7.–11.). Mogla bi dati naznaku u vezi s tim treba li provesti daljnja ispitivanjima i dati smjernice za osmišljavanje naknadnih istraživanja. Za pomoć pri tumačenju rezultata u pogledu reprodukcije i razvoja (19.) treba pogledati Smjernicu OECD-a 43. U Smjernici OECD-a 106 o histološkoj procjeni endokrinih i reproduktivnih ispitivanja na glodavcima (16.) navedene su informacije o pripremi i procjeni (endokrinih) organa i vaginalnih brisova koje mogu biti korisne za ovu ispitnu metodu.

LITERATURA

1. OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokio, 27–29. listopada 1992. Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
3. Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M., Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *J. Toxicol, Sci.*, 19, 141.–149.
4. Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, 89.–95.

5. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10.–11. ožujka 1998., Na zahtjev dostupno kod Organizacije za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
6. OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
7. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
8. Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84.–97.
9. Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
10. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).
11. Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267.–283.
12. Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233.–236.
13. Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 599.–609.
14. Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, *Reproductive Toxicology*, 13: 383.–390.
15. OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
16. OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
17. Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. U: *Methods in Reproductive Toxicology*, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, str. 52.–85.
18. Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524.–533.
19. OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
20. OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

Dodatak 1.

DEFINICIJE (VIDJETI I (20.) SMJERNICU OECD-A 150)

Androgeni učinak je sposobnost kemikalije da djeluje kao prirodni androgeni hormon (npr. testosteron) u organizmu sisavaca.

Antiandrogeni učinak je sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje prirodnog androgenog hormona (npr. testosterona) u organizmu sisavaca.

Antiestrogeni učinak je sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje prirodnog estrogenog hormona (npr. estradiol 17 β) u organizmu sisavaca.

Antitiroidna aktivnost je sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje prirodnog hormona štitnjače (npr. T₃) u organizmu sisavaca.

Kemikalija je tvar ili smjesa.

Razvojna toksičnost manifestacija reproduktivne toksičnosti koju čine prenatalni, postnatalni, strukturni ili funkcionalni poremećaji potomstva.

Doza je količina ispitivane kemikalije koja se primjenjuje. Doza se izražava kao masa ispitivane kemikalije po jedinici tjelesne mase ispitne životinje po danu (npr. mg/kg tjelesne mase po danu) ili kao stalna koncentracija u hrani.

Doziranje je opći pojam koji obuhvaća dozu, njezinu učestalost i trajanje doziranja.

Evidentna toksičnost je opći naziv koji opisuje jasne znakove toksičnosti nakon primjene ispitivane kemikalije. Ti bi znakovi trebali biti dovoljni za utvrđivanje opasnosti i trebaju biti takvi da se za primjenu povišene doze može očekivati da će rezultirati razvojem ozbiljnih znakova toksičnosti i mogućom smrtnošću.

Ometanje plodnosti čine poremećaji muških ili ženskih reproduktivnih funkcija ili reproduktivne sposobnosti.

Toksičnost kod majke štetni učinci na gravidne ženke do kojih dolazi specifično (izravni učinak) ili nespecifično (neizravni učinak) i koji su povezani sa stanjem gravidnosti.

NOAEL je kratica za visinu doze bez vidljivih štetnih učinaka. To je najviša doza pri kojoj se ne opažaju nikakvi štetni učinci povezani s tretiranjem.

Estrogeni učinak je sposobnost kemikalije da djeluje kao prirodni estrogeni hormon (npr. estradiol 17 β) u organizmu sisavaca.

Reproduktivna toksičnost predstavlja štetne učinke na potomstvo i/ili oštećenje muške i ženske reproduktivne funkcije ili sposobnosti.

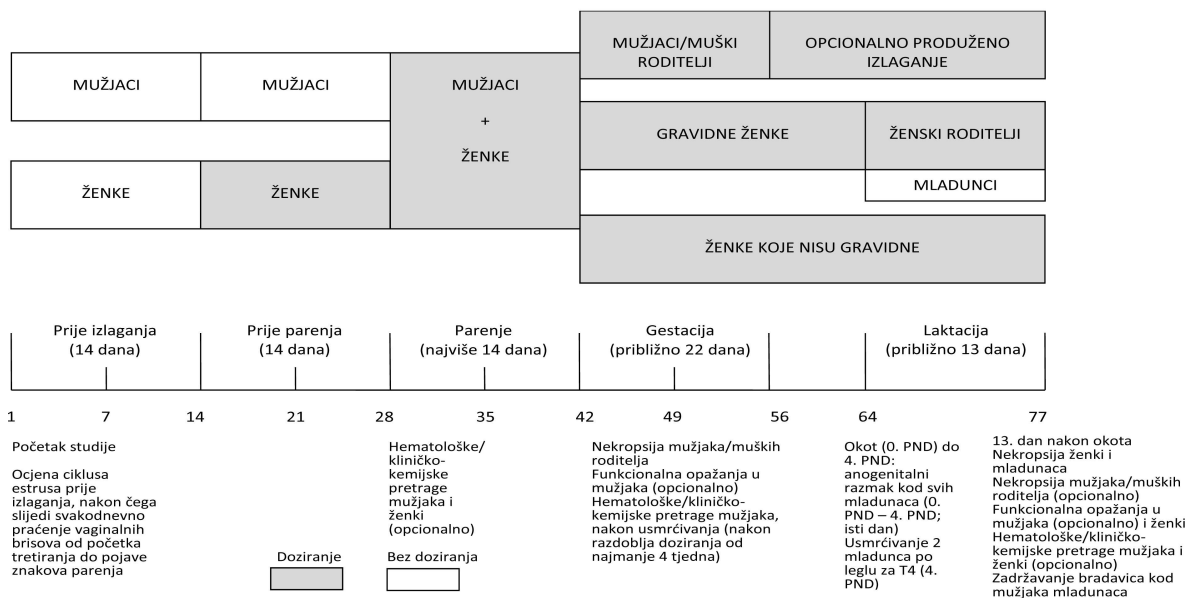
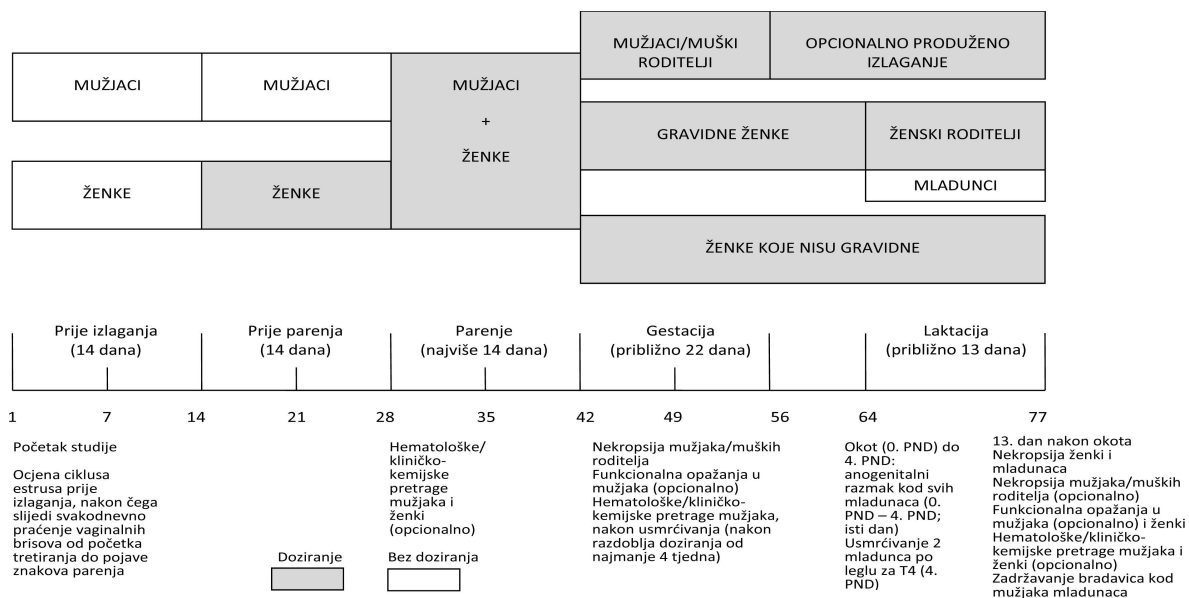
Ispitivana kemikalija je svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Tiroidna aktivnost je sposobnost kemikalije da djeluje kao prirodni hormon štitnjače (npr. T_3) u organizmu sisavaca.

Validacija je znanstveni postupak s ciljem karakterizacije operativnih zahtjeva i ograničenja ispitne metode te pokazivanja njezine pouzdanosti i relevantnosti za određenu svrhu.

Dodatak 2.

DIJAGRAM PLANA POKUSA IZ KOJEG SE VIDI MAKSIMALNO TRAJANJE STUDIJE, NA TEMELJU CIJELOG 14-DNEVNOG RAZDOBLJA PARENJA



Dodatak 3.

SAŽETO IZVJEŠĆE U OBLIKU TABLICE O UČINCIMA NA REPRODUKCIJU/RAZVOJ

OPAŽANJA	VRIJEDNOSTI				
	0 (kontrola)	...	...	...	...
Doziranje (jedinice).....					
Formirani parovi (N)					
Ciklus estrusa (barem srednja vrijednost duljine i učestalost nepravilnih ciklusa)					
Ženke koje pokazuju znakove kopulacije (N)					
Ženke koje su postale gravidne (N)					
Dani začeca 1–5 (N)					
Dani začeca 6–... (!) (N)					
Graviditet ≤ 21 dan (N)					
Graviditet = 22 dana (N)					
Graviditet ≥ 23 dana (N)					
Ženke (majke) sa živim mladuncima (N)					
Ženke (majke) sa živim mladuncima 4. dana nakon okota (N)					
Implantati po ženki (majci) (srednja vrijednost)					
Živi mladunci po ženki (majci) pri okotu (srednja vrijednost)					
Živi mladunci po ženki (majci) 4. dana (srednja vrijednost)					
Omjer spolova (m/ž) pri okotu (srednja vrijednost)					
Omjer spolova (m/ž) 4. dana (srednja vrijednost)					
Masa legla pri okotu (srednja vrijednost)					
Masa legla 4. dana (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca pri okotu (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca u trenutku mjerenja anogenitalnog razmaka (srednja vrijednost za mužjake i srednja vrijednost za ženke)					
Anogenitalni razmak na isti postnatalni dan, dan okota – 4. dan (srednja vrijednost za mužjake i ženke, naznaka postnatalnog dana)					
Masa mladunaca 4. dana (srednja vrijednost)					
Masa mladunaca 13. dana (srednja vrijednost)					
Zadržavanje bradavica kod mužjaka mladunaca 13. dana (srednja vrijednost)					

OPAŽANJA	VRIJEDNOSTI				
ABNORMALNI MLADUNCI					
Ženke (majke) s 0					
Ženke (majke) s 1					
Ženke (majke) s ≥ 2					
GUBITAK POTOMAKA					
Prenatalno (implantacije umanjene za broj živorođenih)					
Ženke s 0					
Ženke s 1					
Ženke s 2					
Ženke s ≥ 3					
Postnatalno (broj živorođenih umanjen za broj živih mladunaca 13. dana nakon okota)					
Ženke s 0					
Ženke s 1					
Ženke s 2					
Ženke s ≥ 3					

(¹) Posljednji dan razdoblja parenja

B.65. **IN VITRO ISPITNA METODA ZA NAGRIZANJE KOŽE S MEMBRANSKOM BARIJEROM**

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 435 (TG) (2015.). Nagrizanje kože odnosi se na izazivanje ireverzibilnog oštećenja kože koje se manifestira kao vidljiva nekroza koja kroz epidermu prodire u dermu nakon primjene ispitivane kemikalije, kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) ⁽¹⁾ Europske unije. Ova ispitna metoda, ekvivalentna ažuriranoj Smjernici OECD-a za ispitivanje 435, pruža *in vitro* ispitnu metodu za nagrizanje kože s membranskom barijerom koja se može upotrebljavati za identifikaciju nagrizajućih kemikalija. U ispitnoj metodi upotrebljava se umjetna membrana koja je osmišljena tako da reagira na nagrizajuće kemikalije na sličan način kao i životinjska koža *in situ*.
2. Nagrizajuće djelovanje na kožu tradicionalno se procjenjivalo primjenom ispitivane kemikalije na kožu živih životinja i procjenom razmjera oštećenja tkiva nakon određenog vremenskog razdoblja (2.). Uz sadašnju ispitnu metodu donesen je niz drugih *in vitro* ispitnih metoda (3. i 4.) kao alternativa standardnom *in vivo* postupku na koži kunića (poglavlje B.4. ovog Priloga; ekvivalentan Smjernici OECD-a za ispitivanje 404) koji se upotrebljava za identifikaciju nagrizajućih kemikalija (2.). U stupnjevanoj strategiji ispitivanja i ocjenjivanja UN GHS-a za procjenu i razvrstavanje nagrizanja kože te u Smjernicama OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (IATA) za nadraživanje/nagrizanje kože preporučuje se upotreba validiranih i prihvaćenih *in vitro* ispitnih metoda u okviru modula 3. i 4. (1. i 5.). U IATA-i je opisano nekoliko modula u kojima se grupiraju izvori informacija i alati za analizu te i. pružaju se smjernice o tome kako integrirati i upotrijebiti postojeće podatke o ispitivanju i podatke koji se dobivaju bez ispitivanja za procjenu potencijala kemikalija da uzrokuju nadraživanje i nagrizanje kože te ii. predlaže se pristup kad je potrebno daljnje ispitivanje, među ostalim i ako se dobiju negativni rezultati (5.). U tom modularnom pristupu pozitivni rezultati iz *in vitro* ispitnih metoda mogu se upotrebljavati za razvrstavanje kemikalije kao nagrizajuće bez potrebe za ispitivanjem na životinjama, čime se smanjuje i poboljšava upotreba životinja te se izbjegavaju bol i patnja do kojih može doći kada bi se u tu svrhu upotrebljavale životinje.
3. Dovršene su validacijske studije za *in vitro* model membranske barijere koji je komercijalno dostupan pod nazivom Corrositex[®] (6., 7. i 8.) i koji pokazuje ukupnu točnost predviđanja nagrizanja kože od 79 % (128/163), osjetljivost od 85 % (76/89) i specifičnost od 70 % (52/74) za bazu podataka od 163 tvari i smjesa (7.). Na temelju njezine potvrđene valjanosti, ova je validirana referentna metoda (VRM) preporučena za upotrebu kao dio stupnjevane strategije ispitivanja za procjenu potencijalne opasnosti kemikalija da uzrokuju nagrizanje kože (5. i 7.). Prije nego što se *in vitro* model membranske barijere za nagrizanje kože može upotrijebiti u regulatorne svrhe, trebalo bi utvrditi njegovu pouzdanost, relevantnost (točnost) i ograničenja za njegovu predloženu uporabu kako bi se osigurala njegova sličnost s validiranom referentnom metodom (9.), u skladu s unaprijed utvrđenim zahtjevima izvedbe (10.). OECD-ovo uzajamno prihvaćanje podataka jamčit će se samo nakon što se svaka predložena nova ili ažurirana metoda koja je u skladu sa zahtjevima izvedbe pregleda i uključi u ekvivalentnu smjernicu OECD-a za ispitivanje. Smjernica OECD-a za ispitivanje 435 trenutačno obuhvaća samo jednu *in vitro* metodu i ovu ispitnu metodu – komercijalno dostupan model Corrositex[®].
4. Ostale ispitne metode za ispitivanje nagrizanja kože temelje se na upotrebi rekonstituirane ljudske kože (Smjernica OECD-a za ispitivanje 431) (3.) i izolirane kože štakora (Smjernica OECD-a za ispitivanje 430) (4.). Ova smjernica za ispitivanje omogućuje i daljnje razvrstavanje nagrizajućih kemikalija u tri potkategorije nagrizanja prema UN GHS-u i tri ambalažne skupine UN-a za prijevoz u pogledu opasnosti od nagrizanja. Ova Smjernica za ispitivanje izvorno je donesena 2006. i ažurirana je 2015. kako bi se odnosila na smjernice o IATA-i i kako bi se ažurirao popis tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti.

DEFINICIJE

5. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

6. Ispitivanje opisano u ovoj ispitnoj metodi omogućuje identifikaciju nagrizajućih ispitivanih kemikalija i daljnje razvrstavanje nagrizajućih ispitivanih kemikalija u skladu s UN GHS-om/CLP-om (tablica 1.). Osim toga, ta se ispitna metoda može upotrebljavati kako bi se donijele odluke o nagrizajućem i nenagrizajućem svojstvu određenih razreda kemikalija, npr. organskih i anorganskih kiselina, derivata kiselina ⁽²⁾ i baza u svrhu ispitivanja određenih vrsta prijevoza (7., 11. i 12.). Ova ispitna metoda opisuje opći postupak koji je sličan validiranoj referentnoj ispitnoj metodi (7.). Iako se ovom ispitnom metodom ne dobivaju primjerene informacije o nadraživanju kože, trebalo bi

⁽¹⁾ Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006, SL L 353/1, 31.12.2008.

⁽²⁾ „Derivat kiseline” je nespecifična oznaka razreda i općenito se definira kao kemikalija koja je nastala iz kiseline izravno, modifikacijom ili djelomičnom zamjenom. Taj razred obuhvaća anhidride, halo kiseline, soli i druge vrste kemikalija.

napomenuti da se ispitna metoda B.46. (ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 439) posebno bavi učinkom nadraženosti kože na zdravlje *in vitro* (13.). Za potpunu evaluaciju lokalnih učinaka na kožu nakon jednostrukog dermalnog izlaganja potrebno je proučiti Smjernice OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni (5.).

Tablica 1.

Kategorija „nagrizajuće za kožu” s potkategorijama prema UN GHS-u ⁽¹⁾

Kategorija nagrizajućeg djelovanja (1. kategorija) (za tijela koja se ne koriste potkategorijama)	Potkategorije potencijalno nagrizajućeg djelovanja ⁽¹⁾ (za tijela koja se koriste potkategorijama, uključujući Uredbu o CLP-u)	Nagrizajuće kod ≥ 1 od 3 životinje	
		Izloženost	Opažanje
Nagrizajuće	Potkategorija nagrizajućeg djelovanja 1.A	≤ 3 minute	≤ 1 sat
	Potkategorija nagrizajućeg djelovanja 1.B	> 3 minute / ≤ 1 sat	≤ 14 dana
	Potkategorija nagrizajućeg djelovanja 1.C	> 1 sat / ≤ 4 sata	≤ 14 dana

⁽¹⁾ Za EU se u Uredbi o CLP-u primjenjuju tri potkategorije nagrizanja kože – 1.A, 1.B i 1.C.

7. Ograničenje validirane referentne metode (7.) je to što mnoge kemikalije koje ne djeluju nagrizajuće i neke kemikalije koje djeluju nagrizajuće možda neće ispuniti uvjete za ispitivanje na temelju rezultata početnog ispitivanja kompatibilnosti (vidjeti stavak 13.). Vodne otopine kemikalija čija je pH-vrijednost u rasponu od 4,5 do 8,5 često ne ispunjavaju uvjete za ispitivanje; međutim, 85 % ispitanih kemikalija u tom pH-rasponu nije djelovalo nagrizajuće u ispitivanjima na životinjama (7.). *In vitro* metoda s membranskom barijerom može se upotrebljavati za ispitivanje krutih tvari (topljivih ili netopljivih u vodi), tekućina (vodenih i bezvodnih) i emulzija. Međutim, ispitivane kemikalije koje ne uzrokuju uočljivu promjenu u ispitivanju kompatibilnosti (tj. promjenu boje u detekcijskom sustavu za kemikalije (CDS) validirane referentne ispitne metode) ne mogu se ispitati primjenom metode s membranskom barijerom i trebale bi se ispitati drugim ispitnim metodama.

NAČELO ISPITIVANJA

8. Ispitni sustav sastoji se od dvije sastavnice: sintetičke makromolekularne biološke barijere i detekcijskog sustava za kemikalije; u ovoj se ispitnoj metodi detekcijskim sustavom za kemikalije otkriva oštećenje membranske barijere koje uzrokuju nagrizajuće ispitivane kemikalije nakon primjene ispitivane kemikalije na površinu sintetičke makromolekularne membranske barijere (7.), uz pretpostavku da se to odvija istim mehanizmima nagrizanja koji djeluju i na živu kožu.
9. Prodiranje kroz membransku barijeru može se mjeriti različitim postupcima ili detekcijskim sustavima za kemikalije, uključujući promjenu boje pH-indikatorske boje ili nekog drugog svojstva otopine indikatora ispod barijere.
10. Trebalo bi se utvrditi da je membranska barijera valjana, tj. relevantna i pouzdana za predviđenu upotrebu. To uključuje i osiguravanje dosljednosti različitih pripravaka u pogledu svojstava barijere, npr. sposobnost očuvanja barijere u dodiru s nenagrizajućim kemikalijama, sposobnost razvrstavanja nagrizajućih svojstava kemikalija prema različitim potkategorijama nagrizajućeg djelovanja prema UN GHS-u (1.). Odluka o razvrstavanju temelji se na vremenu koje je kemikaliji potrebno da prođe kroz membransku barijeru do otopine indikatora.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

11. Prije rutinske upotrebe *in vitro* metode s membranskom barijerom koja je u skladu s ovom ispitnom metodom laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost pravilnim utvrđivanjem kategorije dvanaest tvari za dokazivanje osposobljenosti koje su preporučene u tablici 2. U slučajevima u kojima nije dostupna navedena tvar ili ako je to opravdano, može se upotrijebiti druga tvar za koju su dostupni primjereni referentni *in vivo* i *in vitro* podaci (npr. s popisa referentnih kemikalija (10.)) pod uvjetom da se primjenjuju isti kriteriji za odabir kako su opisani u tablici 1.

Tablica 2.

Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti ⁽¹⁾

Tvar ⁽²⁾	CAS br.	Kemijski razred	<i>In vivo</i> UN GHS-u potkategorija prema ⁽³⁾	<i>In vitro</i> potkategorija prema UN GHS-u ⁽³⁾
Borov trifluorid dihidrat	13319-75-0	Anorganske kiseline	1.A	1.A
Dušična kiselina	7697-37-2	Anorganske kiseline	1.A	1.A
Fosforov pentaklorid	10026-13-8	Prekursori anorganskih kiselina	1.A	1.A
Valeril klorid	638-29-9	Kloridi kiselina	1.B	1.B
Natrijev hidroksid	1310-73-2	Anorganske baze	1.B	1.B
1-(2-aminoetil)piperazin	140-31-8	Alifatski amini	1.B	1.B
Benzensulfonil klorid	98-09-9	Kloridi kiselina	1.C	1.C
N,N-dimetil-benzilamin	103-83-3	Anilini	1.C	1.C
Tetraetilenpentamin	112-57-2	Alifatski amini	1.C	1.C
Eugenol	97-53-0	Fenoli	NC	NC
Nonil akrilat	2664-55-3	Akrihati/metakrihati	NC	NC
Natrijev bikarbonat	144-55-8	Anorganske soli	NC	NC

⁽¹⁾ Dvanaest prethodno navedenih tvari sadržavaju tri tvari iz svake od triju potkategorija nagrizajućih tvari i tri nenagrizajuće tvari prema UN GHS-u, lako su dostupne kod komercijalnih dobavljača, a potkategorija prema UN GHS-u temelji se na rezultatima visokokvalitetnog *in vivo* ispitivanja. Te su tvari preuzete s popisa od 40 referentnih tvari koje su uključene na minimalni popis kemikalija koje su identificirane za dokazivanje točnosti i pouzdanosti ispitnih metoda koje su strukturno i funkcionalno slične validiranoj referentnoj ispitnoj metodi i odabrane su među 163 referentne kemikalije koje su se izvorno koristile za validaciju ispitne metode (Corrositex[®]) (7., 10. i 14.). Tim se procesom odabira nastojalo uključiti, u mjeri u kojoj je to moguće, kemikalije koje su bile reprezentativne za raspon nagrizajućih odgovora (npr. tvari koje ne djeluju nagrizajuće, nagrizajuće tvari ambalažne skupine UN-a I., II. i III.) koji se mogu izmjeriti ili predvidjeti validiranom referentnom ispitnom metodom; koje su bile reprezentativne za kemijske razrede koji su korišteni tijekom procesa validacije; koje imaju dobro utvrđene kemijske strukture; koje su inducirale ponovljive rezultate u validiranoj referentnoj ispitnoj metodi; koje su inducirale konačne rezultate u *in vivo* referentnom ispitivanju; koje su bile komercijalno dostupne; i koje nisu bile povezane s neprimjereno visokim troškovima zbrinjavanja (14.).

⁽²⁾ Tvari ispitane čiste ili čistoće ≥ 90 %.

⁽³⁾ Odgovarajuće ambalažne skupine UN-a I., II. i III. za potkategorije 1.A, 1.B odnosno 1.C UN GHS-a. NC: nije nagrizajuće.

POSTUPAK

- U sljedećim se stavcima opisuju sastavnice i postupci ispitne metode s umjetnom membranskom barijerom za procjenu nagrizajućeg djelovanja (7. i 15.) na temelju važeće validirane referentne metode, tj. komercijalno dostupnog modela Corrositex[®]. Membranska barijera i otopine za utvrđivanje kompatibilnosti/otopine indikatora i otopine za razvrstavanje mogu se izraditi, pripremiti ili nabaviti iz komercijalnih izvora, kao što je slučaj s validiranom referentnom metodom – Corrositex[®]. Dostupan je uzorak protokola ispitne metode za validiranu referentnu ispitnu metodu (7.). Ispitivanje bi se trebalo provoditi na temperaturi okoline (17–25 °C) i sastavnice bi trebale biti u skladu sa sljedećim uvjetima.

Ispitivanje kompatibilnosti ispitivane kemikalije

- Prije provedbe ispitivanja s membranskom barijerom provodi se ispitivanje kompatibilnosti kako bi se utvrdilo može li detekcijski sustav za kemikalije otkriti ispitivanu kemikaliju. Ako detekcijski sustav za kemikalije ne otkrije kemikaliju, ispitna metoda s membranskom barijerom nije primjerena za procjenu potencijalnog nagrizajućeg djelovanja te ispitivane kemikalije i trebalo bi upotrijebiti drugu ispitnu metodu. Detekcijski sustav za kemikalije i uvjeti izlaganja koji se upotrebljavaju za ispitivanje kompatibilnosti trebali bi odražavati izlaganje u kasnijem ispitivanju s membranskom barijerom.

Test kategorizacije ispitivane kemikalije s obzirom na vremenski okvir

14. Ako je primjereno za ispitnu metodu, ispitivanu kemikaliju koja je u ispitivanju kompatibilnosti ispunila uvjete treba podvrgnuti testu kategorizacije s obzirom na vremenski okvir, tj. testu probira kojim se razlikuju slabe i jake kiseline i baze. Na primjer, u validiranoj referentnoj metodi test kategorizacije s obzirom na vremenski okvir služi za određivanje koji bi se od dva vremenska okvira trebao upotrijebiti na temelju toga je li otkrivena znatna kiselina ili alkalna rezerva. Za utvrđivanje nagrizajućeg djelovanja i potkategorije nagrizajućeg djelovanja na kožu prema UN GHS-u trebalo bi upotrijebiti dva različita vremenska okvira, na temelju kisele ili alkalne rezerve ispitivane kemikalije.

SASTAVNICE ISPITNE METODE S MEMBRANSKOM BARIJEROM

Membranska barijera

15. Membranska barijera ima dvije sastavnice: proteinski makromolekularni vodeni gel i propusnu potpornu membranu. Proteinski gel trebao bi biti nepropustan za tekućine i krute tvari, ali trebao bi moći korodirati i postati propustan. Potpuno izrađenu membransku barijeru trebalo bi pohraniti u unaprijed utvrđenim uvjetima za koje se pokazalo da onemogućuju pogoršanje kvalitete gela, npr. sušenje, rast mikroba, pomicanje, pucanje, koje bi narušilo njegovu učinkovitost. Treba utvrditi prihvatljivo vrijeme skladištenja te se priprema membranske barijere ne koriste nakon tog razdoblja.
16. Propusna potporna membrana pruža mehaničku potporu proteinskom gelu tijekom procesa geliranja i izlaganja ispitivanoj kemikaliji. Potporna membrana trebala bi spriječiti ulegnuće ili pomicanje gela i biti propusna za sve ispitivane kemikalije.
17. Proteinski gel, koji se sastoji od proteina, npr. keratina, kolagena, ili mješavine proteina, čini matricu gela i služi kao cilj za ispitivanu kemikaliju. Proteinski materijal stavlja se na površinu potporne membrane i ostavlja se da se stvori gel prije nego što se membranska barijera stavi na otopinu indikatora. Proteinski gel posvud bi trebao biti jednake debljine i gustoće te ne bi trebao sadržavati mjehuriće zraka ili nedostatke koji bi mogli utjecati na njegov funkcionalni integritet.

Detekcijski sustav za kemikalije (CDS)

18. Otopina indikatora (ista otopina koja se upotrebljavala za ispitivanje kompatibilnosti) treba reagirati u prisutnosti ispitivane kemikalije. Treba se koristiti pH-indikatorskom bojom ili kombinacijom boja, npr. krezol crvenilom i metiloranžom, koja će promijeniti boju u prisutnosti ispitivane kemikalije. Sustav mjerenja može biti vizualni ili elektronički.
19. Detekcijski sustavi razvijeni za otkrivanje prolazaka ispitivane kemikalije kroz membransku barijeru treba procijeniti u pogledu relevantnosti i pouzdanosti kako bi se utvrdio raspon kemikalija koje se mogu otkriti i kvantitativna ograničenja otkrivanja.

PROVOĐENJE TESTA

Sastavljanje sastavnica ispitne metode

20. Membranska barijera postavlja se u bočicu (ili cijev) koja sadržava otopinu indikatora tako da je potporna membrana potpuno u kontaktu s otopinom indikatora i da nisu prisutni mjehurići zraka. Treba paziti da se osigura integritet barijere.

Primjena ispitivane kemikalije

21. Primjerena količina ispitivane kemikalije, npr. 500 µl tekućine ili 500 mg krute tvari fino usitnjene u prah (7.) pažljivo se u slojevima nanosi na gornju površinu membranske barijere i ravnomjerno raspoređuje. Za svaku ispitivanu kemikaliju i njezine odgovarajuće kontrole priprema se odgovarajući broj ponovljenih uzoraka, npr. četiri (7.), (vidjeti stavke od 23. do 25.). Evidentira se vrijeme primjene ispitivane kemikalije na membransku barijeru. Kako bi se osiguralo da se kratka vremena nagrizanja točno evidentiraju, vremena primjene ispitivane kemikalije na ponovljene bočice postupno se mijenjaju.

Mjerenje prodiranja kroz membransku barijeru

22. Svaka se bočica primjereno prati i evidentira se vrijeme prve promjene otopine indikatora, tj. prodiranja kroz barijeru, te se utvrđuje vrijeme koje je proteklo od primjene do prodiranja kroz membransku barijeru.

Kontrole

23. Kod ispitivanja u kojima se s ispitivanom kemikalijom upotrebljava nosač ili otapalo, nosač ili otapalo treba biti kompatibilno sa sustavom membranske barijere, tj. ne smije izmijeniti integritet sustava membranske barijere ni nagrizaćuće djelovanje ispitivane kemikalije. Ako je primjenjivo, kontrolu otapala (ili nosača) treba ispitati istodobno kad i ispitivanu kemikaliju kako bi se dokazala kompatibilnost otapala sa sustavom membranske barijere.
24. Pozitivnu (nagrizaćuću) kontrolu sa srednje nagrizaćućom aktivnosti, npr. 110 ± 15 mg natrijeva hidroksida (potkategorija 1.B nagrizaćućeg djelovanja prema UN GHS-u) (7.) treba ispitati istodobno kad i ispitivanu kemikaliju kako bi se procijenilo funkcionira li ispitni sustav zadovoljavajuće. Za procjenu relativnog potencijala za nagrizaćuće djelovanje nagrizaćuće ispitivane kemikalije može biti korisna druga pozitivna kontrola iz istog kemijskog razreda kao ispitivana kemikalija. Treba odabrati pozitivnu kontrolu ili kontrole srednje nagrizaćućeg djelovanja (npr. potkategorija 1.B prema UN GHS-u) kako bi se otkrile promjene u vremenu prodiranja koje mogu biti neprihvatljivo dulje ili kraće od utvrđene referentne vrijednosti, što ukazuje na to da ispitni sustav ne funkcionira pravilno. Korisnost kemikalija koje djeluju iznimno nagrizaćuće (potkategorija 1.A prema UN GHS-u) ili koje ne djeluju nagrizaćuće u tu je svrhu ograničena. Nagrizaćuća kemikalija iz potkategorije 1.B prema UN GHS-u omogućila bi otkrivanje predugog ili prekratkog vremena prodiranja. Kemikalija slabo nagrizaćuće djelovanja (potkategorija 1.C prema UN GHS-u) mogla bi se upotrijebiti kao pozitivna kontrola za mjerenje sposobnosti ispitne metode da dosljedno razlikuje kemikalije koje imaju slabo nagrizaćuće djelovanje od kemikalija koje ne djeluju nagrizaćuće. Neovisno o tome koji se pristup primjenjuje, treba razviti prihvatljivi raspon odgovora pozitivne kontrole na temelju prijašnjeg raspona vremena prodiranja za primijenjenu pozitivnu kontrolu ili kontrole, kao što je srednja vrijednost $\pm 2-3$ standardne devijacije. U svakoj studiji treba utvrditi točno vrijeme prodiranja za pozitivnu kontrolu kako bi se mogle otkriti devijacije koje su izvan prihvatljivog raspona.
25. Negativnu (nenagrizaćuću) kontrolu, npr. 10-postotnu limunsku kiselinu, 6-postotnu propionsku kiselinu (7.) isto bi trebalo ispitati istodobno kad i ispitivanu kemikaliju kao još jednu mjeru kontrole kvalitete za dokazivanje funkcionalnog integriteta membranske barijere.

Kriteriji prihvatljivosti istraživanja

26. U skladu s utvrđenim vremenskim parametrima za svaku potkategoriju nagrizaćućeg djelovanja prema UN GHS-u, vrijeme (u minutama) koje protekne od primjene ispitivane kemikalije na membransku barijeru do prodiranja kroz barijeru služi za predviđanje nagrizaćućeg djelovanja ispitivane kemikalije. Da bi se istraživanje smatralo prihvatljivim, istodobna pozitivna kontrola trebala bi pokazati očekivano vrijeme reakcije prodiranja (npr. vrijeme prodiranja od osam do 16 minuta za natrijev hidroksid ako se upotrebljava kao pozitivna kontrola), istodobna negativna kontrola ne bi trebala djelovati nagrizaćuće, a ako je uključena, istodobna kontrola s otapalom ne bi trebala djelovati nagrizaćuće ni izmijeniti potencijal za nagrizaćuće djelovanje ispitivane kemikalije. Laboratoriji bi prije rutinske primjene metode koja ispunjava zahtjeve ove ispitne metode trebali dokazati tehničku osposobljenost primjenom 12 tvari preporučenih u tablici 2. Za nove *me-too* metode koje se razvijaju na temelju ove ispitne metode i koje su strukturno i funkcionalno slične validiranoj referentnoj metodi (14.) trebaju se upotrebljavati unaprijed definirani zahtjevi izvedbe kako bi se dokazala pouzdanost i točnost nove metode prije njezine primjene za ispitivanje u regulatorne svrhe (10.).

Tumačenje rezultata i razvrstavanje ispitivanih kemikalija prema nagrizaćućem djelovanju

27. Vrijeme (u minutama) koje protekne od primjene ispitivane kemikalije na membransku barijeru do prodiranja kroz barijeru služi za razvrstavanje ispitivane kemikalije u potkategorije nagrizaćućeg djelovanja prema UN GHS-u (1.) i, ako je primjenjivo, u ambalažne skupine UN-a (16.). Granične vrijednosti vremena za svaku od tri potkategorije nagrizaćućeg djelovanja utvrđuju se za svaku predloženu ispitnu metodu. U konačnim odlukama o graničnim vremenima treba uzeti u obzir potrebu da se smanji preblago razvrstavanje opasnosti od nagrizaćućeg djelovanja (tj. lažno negativni rezultati). U ovoj smjernici za ispitivanje trebala bi se koristiti granična vremena za Corrositex®, kako su navedena u tablici 3., jer je to jedina ispitna metoda koja je trenutačno obuhvaćena ovom smjernicom za ispitivanje (7.).

Tablica 3.

Model predviđanja Corrositex®

Srednje vrijeme prodiranja (min.)		Predviđanje prema sustavu UN GHS ⁽³⁾
Ispitivana kemikalija 1. kategorije ⁽¹⁾ (utvrđeno testom kategorizacije, koji je dio metode)	Ispitivana kemikalija 2. kategorije ⁽²⁾ (utvrđeno testom kategorizacije, koji je dio metode)	
0–3 min	0–3 min	Nagrizajuće, neobavezna potkategorija 1.A
> 3 do 60 min	> 3 do 30 min	Nagrizajuće, neobavezna potkategorija 1.B
> 60 do 240 min	> 30 do 60 min	Nagrizajuće, neobavezna potkategorija 1.C
> 240 min	> 60 min	Nije nagrizajuće

⁽¹⁾ Ispitivana kemikalija s velikom kiselim/alkalnom rezervom (6.)⁽²⁾ Ispitivana kemikalija s malom kiselim/alkalnom rezervom (6.)⁽³⁾ Potkategorije 1.A, 1.B i 1.C UN GHS-a odgovaraju ambalažnim skupinama UN-a I., II. odnosno III.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

28. Vrijeme (u minutama) koje prođe od primjene ispitivane kemikalije i pozitivne kontrole ili kontrola do prodiranja barijere treba prikazati u tabličnom obliku kao podatke o pojedinačnim ponovljenim uzorcima te srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija za svaki pokus.

Izvješće o ispitivanju

29. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija i kontrolne tvari:

- tvar s jednim sastojkom: kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa: opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka,
- fizički izgled, topljivost u vodi i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- izvor, broj serije, ako su dostupni,
- tretiranje ispitivane kemikalije/kontrolne tvari prije ispitivanja, ako je primjenljivo (npr. grijanje, mljevenje),
- stabilnost ispitivane kemikalije, rok uporabe ili datum za ponovnu analizu ako je poznat,
- uvjeti skladištenja.

Nosač:

- identifikacijska oznaka, koncentracija (prema potrebi), upotrijebljeni volumen,
- obrazloženje za odabir nosača.

Upotrijebljeni in vitro model membranske barijere i protokol, uključujući dokazanu točnost i pouzdanost

Ispitni uvjeti:

- opis korištenog uređaja i postupaka pripreme,
- podrijetlo i sastav korištene *in vitro* membranske barijere,
- sastav i svojstva otopine indikatora,
- metoda detekcije,
- količina ispitivane kemikalije i kontrolne tvari,
- broj ponavljanja,
- opis i obrazloženje testa kategorizacije s obzirom na vremenski okvir,
- način primjene,
- vremena opažanja,
- opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i razvrstavanja,
- dokazivanje osposobljenosti za izvođenje ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem kemikalija za dokazivanje tehničke osposobljenosti.

Rezultati:

- tablični prikaz pojedinačnih neobrađenih podataka o pojedinačnim ispitnim i kontrolnim uzorcima za svako ponavljanje,
- opis drugih uočenih učinaka,
- utvrđeno razvrstavanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterije odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

1. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York i Ženeva, 2013. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
2. Poglavlje B.4. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje kože.
3. Poglavlje B.40.bis ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: ispitna metoda na modelu rekonstruirane ljudske epiderme (RhE).

4. Poglavlje B.40. ovog Priloga, Nagrizanje kože *in vitro*: transkutani električni otpor (TER).
5. OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
6. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicology In Vitro* 12, 483.–524.
7. ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495).
8. Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology* 10, 37.–45.
9. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).
10. OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.
11. ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italija. ATLA 29, 96.–97.
12. U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (20. rujna 2002.). Washington, D.C., U.S. DOT.
13. Poglavlje B.46. ovog Priloga, Nadraživanje kože *in vitro*: ispitna metoda na modelu rekonstruirane ljudske epiderme. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Dostupno na: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.
14. U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Dostupno na: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
15. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Dostupno na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Dodatak

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (9.).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Detekcijski sustav za kemikalije (CDS): vizualni ili elektronički sustav mjerenja s otopinom indikatora koja reagira u prisutnosti ispitivane kemikalije, npr. promjenom pH-indikatorske boje ili kombinacije boja, koja će promijeniti boju u prisutnosti ispitivane kemikalije ili drugim vrstama kemijskih ili elektrokemijskih reakcija.

Podudarnost: mjerilo učinkovitosti ispitne metode za ispitne metode koje daju kategorijski rezultat i jedan je od aspekata relevantnosti. Pojam je ponekad međusobno zamjenjiv s pojmom točnosti i definira se kao udio svih ispitanih kemikalija koje su pravilno razvrstane kao pozitivne ili negativne. Podudarnost u velikoj mjeri ovisi o prisutnosti pozitivnih rezultata u vrstama ispitivane kemikalije (9.).

GHS (Globalno usklađeni sustav razvrstavanja i označivanja kemikalija): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti te opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (1.).

IATA: integrirani pristup ispitivanju i procjeni.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % (w/w) ili većoj te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

NC: nije nagrizajuće.

Zahtjevi izvedbe: zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Obuhvaćaju: i. ključne elemente ispitne metode; ii. minimalni popis referentnih kemikalija odabranih među kemikalijama koje se upotrebljavaju za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode te iii. slične razine pouzdanosti i točnosti, utemeljene na rezultatima dobivenim za validiranu ispitnu metodu, koje se prilikom ocjenjivanja trebaju dokazati predloženom ispitnom metodom koristeći minimalni popis referentnih kemikalija (9.).

Relevantnost: opis odnosa između ispitne metode i istraživnog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitnom metodom točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitne metode (9.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija (9.).

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (9.).

Nagrizanje kože *in vivo*: uzrokovanje ireverzibilnog oštećenja kože, točnije, vidljive nekroze koja kroz epidermu dopire u dermu nakon što je ispitivana kemikalija primjenjivana u trajanju do najviše četiri sata. Za nagrizanje kože tipična je pojava čireva, krvarenja, krvavih krasta te, do kraja opažanja od 14 dana, gubitak boje kože zbog nestajanja pigmenta, cijele površine zahvaćene alopecijom (gubitak dlake) i ožiljci. Za ocjenjivanje sumnjivih lezija treba razmotriti mogućnost histopatoloških pretraga.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitne metode. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (9.).

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnom stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi ili biološki materijali.

B.66. IN VITRO TESTOVI TRANSAKTIVACIJE SA STABILNOM TRANSFEKCIJOM ZA OTKRIVANJE AGONISTA I ANTAGONISTA ESTROGENSKIH RECEPTORA**OPĆI UVOD****Smjernica OECD-a za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti**

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 455 (TG) (2016.). Smjernica za ispitivanje 455 je smjernica za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti (PBTG) i u njoj se opisuje metodologija *in vitro* testova transaktivacije sa stabilnom transfekcijom za otkrivanje agonista i antagonista estrogenskih receptora (ER TA testovi). Sastoji se od nekoliko mehanicistički i funkcionalno sličnih ispitnih metoda za identifikaciju agonista i antagonista estrogenskih receptora (tj. ER α i/ili ER β) i trebala bi olakšati razvoj novih sličnih ili izmijenjenih ispitnih metoda u skladu s načelima za validaciju utvrđenima u Vodiču OECD-a o validaciji i međunarodnom prihvatanju novih ili ažuriranih ispitnih metoda za procjenu opasnosti (1.). Potpuno validirane referentne ispitne metode (Dodatak 2. i Dodatak 3.) koje čine osnovu ove smjernice za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti uključuju:

— test TA sa stabilnom transfekcijom (STTA) (2.) uz primjenu stanične linije (h) ER α -HeLa-9903, i

— test VM7Luc ER TA (3.) uz primjenu stanične linije VM7Luc4E2 (¹), koja većinom izražava receptor hER α uz određeni doprinos receptora hER β (4. i 5.).

Za razvoj i validaciju sličnih testova za iste konačne učinke opasnosti dostupni su zahtjevi izvedbe (6. i 7.) te bi ih trebalo upotrebljavati. Oni omogućuju pravovremenu izmjenu PBTG-a 455 kako bi se novi slični testovi mogli dodati u ažurirani PBTG; međutim, slični testovi dodat će se samo nakon što ih OECD pregleda i složi se da su ispunjeni zahtjevi izvedbe. Testovi uključeni u Smjernicu za ispitivanje 455 mogu se upotrebljavati bez razlike za ispunjavanje zahtjeva zemalja članica OECD-a u pogledu rezultata ispitivanja transaktivacije estrogenskih receptora, uz ostvarivanje koristi od OECD-ova uzajamnog prihvatanja podataka.

Kontekst i načela testova uključenih u ovu ispitnu metodu

2. OECD je 1998. pokrenuo aktivnost visokog prioriteta revizije postojećih i razvoja novih smjernica za ispitivanje za probir i ispitivanje potencijalnih endokrino disruptivnih kemikalija. OECD-ov konceptualni okvir (CF) za ispitivanje i procjenu potencijalnih endokrino disruptivnih kemikalija revidiran je 2012. Izvorni i revidirani konceptualni okviri uključeni su kao prilozi Vodiču OECD-a o standardiziranim ispitnim smjernicama za ocjenu kemikalija u pogledu endokrine disrupcije (8.). Konceptualni okvir sastoji se od pet razina, a svaka razina odgovara različitoj razini biološke složenosti. Testovi ER transaktivacije (TA) opisani u ovoj ispitnoj metodi testovi su 2. razine, koja uključuje „*in vitro* testove koji pružaju podatke o odabranim endokrinim mehanizmima/putovima”. Ova je ispitna metoda namijenjena *in vitro* testovima transaktivacije (TA) koji su osmišljeni za identifikaciju agonista i antagonista estrogenskih receptora (ER).
3. Interakcija estrogena i estrogenskih receptora može utjecati na transkripciju gena koje kontrolira estrogen, a to može dovesti do indukcije ili inhibicije staničnih procesa, među ostalim i onih koji su potrebni za proliferaciju stanica, normalni razvoj fetusa i reproduktivnu funkciju (9., 10. i 11.). Poremećaj uobičajenih estrogenskih sustava mogao bi izazvati štetne učinke za normalni razvoj (ontogeneza), reproduktivno zdravlje i integritet reproduktivnog sustava.
4. *In vitro* TA testovi temelje se na izravnoj ili neizravnoj interakciji tvari sa specifičnim receptorom koji regulira transkripciju proizvoda reporterskog gena. Ti se testovi u velikoj mjeri upotrebljavaju za procjenu genske ekspresije koju reguliraju specifični receptori u jezgri, kao što su estrogenski receptori (12., 13., 14., 15. i 16.). Predloženi su za otkrivanje estrogenske transaktivacije koju regulira estrogenski receptor (17., 18. i 19.). Postoje najmanje dvije glavne podvrste estrogenskih receptora u jezgri, α i β , a kodiraju ih posebni geni. Pojedini proteini imaju različite biološke funkcije te različitu distribuciju u tkivima i afinitete vezanja liganda (20., 21., 22., 23., 24., 25. i 26.). Jezgreni ER α posreduje u klasičnom estrogenskom odgovoru (27., 28., 29. i 30.) pa je stoga većina modela koji se trenutačno razvijaju za mjerenje aktivacije ili inhibicije estrogenskog receptora specifična za ER α . Testovi se upotrebljavaju za identifikaciju kemikalija koje aktiviraju (ili inhibiraju) estrogenski receptor nakon vezivanja liganda, nakon čega se kompleks receptora i liganda veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen, što dovodi do povećane stanične ekspresije markerskog proteina. U tim se testovima mogu koristiti različiti reporterski odgovori.

U sustavima koji se temelje na luciferazi, enzim luciferaza pretvara supstrat luciferina u bioluminiscentni proizvod koji se može kvantitativno izmjeriti s pomoću luminometra. Drugi primjeri uobičajenih reporterskih gena uključuju fluorescentni protein i gen *LacZ*, koji kodira β -galaktozidazu, enzim koji može pretvoriti bezbojni supstrat X-gal (5-bromo-4-kloro-indolil-galaktopiranozid) u plavi proizvod koji se može kvantificirati spektrofotometrom. Ti se reporterski geni mogu procijeniti brzo i jeftino primjenom komercijalno dostupnog pribora za ispitivanje.

5. Validacijske studije STTA i VM7Luc TA testova pokazale su relevantnost i pouzdanost tih testova za predviđenu svrhu (3., 4., 5. i 30.). Zahtjevi izvedbe za ER TA testove koji se temelje na luminiscenciji u kojima se upotrebljavaju stanične linije mliječnih žlijezda uključene su u Evaluacijsko izvješće ICCVAM-a o ispitnoj metodi LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): *in vitro* test za identifikaciju agonističkog ili antagonističkog djelovanja kemikalije na ljudski estrogenski receptor (3.). Ti su zahtjevi izvedbe izmijenjeni kako bi se mogli primjenjivati i na STTA i VM7Luc TA testove (2.).
6. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi opisuju se u Dodatku 1.

Područje primjene TA testova i ograničenja povezana s njima

7. Ovi se testovi predlažu u svrhu probira i utvrđivanja prioriteta, ali u njima se mogu dobiti i mehanicističke informacije koje se mogu upotrijebiti u pristupu snage dokaza. Bave se transaktivacijom koju inducira kemijsko vezivanje na estrogenske receptore u *in vitro* sustavu. Stoga rezultate ne bi trebalo izravno ekstrapolirati na signalizaciju kompleksa i regulaciju netaknutog endokrinog sustava *in vivo*.
8. Transaktivacija koju posreduju estrogenski receptori smatra se jednim od ključnih mehanizama endokrine disrupcije (ED), iako postoje i drugi mehanizmi preko kojih može doći do endokrine disrupcije, uključujući: i. interakcije s ostalim receptorima i enzimskim sustavima u endokrinom sustavu; ii. sintezu hormona; iii. metaboličku aktivaciju i/ili inaktivaciju hormona; iv. distribuciju hormona u ciljna tkiva i v. uklanjanje hormona iz tijela. Ni jedan test u okviru ove ispitne metode ne bavi se tim načinima djelovanja.
9. Ova se ispitna metoda bavi sposobnošću kemikalija da aktiviraju (tj. djeluju kao agonisti) i da potiskuju (tj. djeluju kao antagonisti) transkripciju koja ovisi o estrogenskim receptorima. Određene kemikalije mogu pokazati i agonističko i antagonističko djelovanje ovisno o vrsti stanica i poznate su kao selektivni modulatori estrogenskih receptora (SERM-ovi). Kemikalije koje su u ovim testovima negativne mogle bi se procijeniti u testovima vezivanja na estrogenski receptor prije nego što se zaključi da se kemikalija ne veže na receptor. Osim toga, u ovim će se testovima vjerojatno dobiti samo podaci o aktivnosti polazne molekule, imajući na umu ograničene metaboličke mogućnosti *in vitro* staničnih sustava. Budući da su se u validaciji upotrebljavale samo pojedinačne tvari, nije se razmatrala primjenjivost za ispitivanje smjesa. Unatoč tomu, ova je ispitna metoda u teoriji primjenjiva za ispitivanje tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na tvari s više sastojaka, UVCB tvari ili smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se te, ako se mogu, zašto se njome mogu dobiti primjereni rezultati za tu svrhu. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.
10. U informativne svrhe u tablici 1. navedeni su rezultati ispitivanja agonista za 34 tvari koje su ispitane u obje potpuno validirane ispitne metode opisane u ovoj ispitnoj metodi. Od tih tvari 26 ih je razvrstano kao definitivni agonisti estrogenskih receptora, a osam ih je bilo negativno na temelju objavljenih izvješća, uključujući *in vitro* testove za vezivanje estrogenskih receptora i transaktivaciju i/ili uterotrofni test (2., 3., 18., 31., 32., 33. i 34.). U tablici 2. navedeni su rezultati ispitivanja antagonista za 15 tvari koje su ispitane u obje potpuno validirane ispitne metode opisane u ovoj ispitnoj metodi. Od tih tvari četiri su razvrstane kao definitivni/pretpostavljeni antagonisti estrogenskih receptora, a deset ih je bilo negativno na temelju objavljenih izvješća, uključujući *in vitro* testove za vezivanje estrogenskih receptora i transaktivaciju (2., 3., 18. i 31.). S obzirom na podatke sažete u tablicama 1. i 2., postojalo je 100-postotno slaganje obiju referentnih ispitnih metoda o razvrstavanju svih tvari osim jedne tvari (mifepristona) u testu antagonista i svaka je tvar točno razvrstana kao agonist/antagonist estrogenskih receptora ili kao negativna tvar. Dodatne informacije o ovoj skupini kemikalija i o dodatnim kemikalijama koje su ispitane u STTA i VM7Luc ER TA testovima tijekom validacijskih studija navedene su u zahtjevima izvedbe za testove ER TA (6. i 7.), Dodatak 2. (tablice 1., 2. i 3.).

Tablica 1.
Pregled rezultata iz STTA i VM7Luc ER TA testova za tvari ispitane u oba testa agonista i razvrstane kao agonisti estrogenskog receptora (POZ) ili negativne tvari (NEG)

	Tvar	CAS br.	STTA test ⁽¹⁾			VM7Luc ER TA test ⁽²⁾		Izvor podataka za razvrstavanje ⁽⁴⁾		
			ER TA aktivnost	Vrijednost PC ₁₀ (M)	Vrijednost PC ₅₀ ^(b) (M)	ER TA aktivnost	Vrijednost EC ₅₀ ^(b) , ^(c) (M)	Ostali ER TA- ovi ^(c)	Vezivanje ER-a	Uterotrofni
1	17β-estradiol ^(a)	50-28-2	POZ	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	POZ	5,63 × 10 ⁻¹²	POZ (22.7/22.7)	POZ	POZ
2	17α-estradiol ^(a)	57-91-0	POZ	7,24 × 10 ⁻¹¹	6,44 × 10 ⁻¹⁰	POZ	1,40 × 10 ⁻⁹	POZ (11/11)	POZ	POZ
3	17α-etinilestra- diol ^(a)	57-63-6	POZ	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	POZ	7,31 × 10 ⁻¹²	POZ (22/22)	POZ	POZ
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POZ	1,78 × 10 ⁻⁸	2,73 × 10 ⁻⁷	POZ	4,20 × 10 ⁻⁸	POZ (2/2)	NI	NI
5	19-nortestoste- ron ^(a)	434-22-0	POZ	9,64 × 10 ⁻⁹	2,71 × 10 ⁻⁷	POZ	1,80 × 10 ⁻⁶	POZ (4/4)	POZ	POZ
6	4-kumilfenol ^(a)	599-64-4	POZ	1,49 × 10 ⁻⁷	1,60 × 10 ⁻⁶	POZ	3,20 × 10 ⁻⁷	POZ (5/5)	POZ	NI
7	4-tert-oktilfenol ^(a)	140-66-9	POZ	1,85 × 10 ⁻⁹	7,37 × 10 ⁻⁸	POZ	3,19 × 10 ⁻⁸	POZ (21/24)	POZ	POZ
8	Apigenin ^(a)	520-36-5	POZ	1,31 × 10 ⁻⁷	5,71 × 10 ⁻⁷	POZ	1,60 × 10 ⁻⁶	POZ (26/26)	POZ	NI

	Tvar	CAS br.	STTA test ⁽¹⁾			VM7Luc ER TA test ⁽²⁾		Izvor podataka za razvrstavanje ⁽⁴⁾		
			ER TA aktivnost	Vrijednost PC ₁₀ (M)	Vrijednost PC ₅₀ (M)	ER TA aktivnost	Vrijednost EC ₅₀ ^(b) , ⁽³⁾ (M)	Ostali ER TA- ovi ^(c)	Vezivanje ER-a	Uterotrofni
9	Atrazin ⁽⁴⁾	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NI
10	Bisfenol A ⁽⁴⁾	80-05-7	POZ	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	POZ	$5,33 \times 10^{-7}$	POZ (65/65)	POZ	POZ
11	Bisfenol B ⁽⁴⁾	77-40-7	POZ	$2,36 \times 10^{-8}$	$2,11 \times 10^{-7}$	POZ	$1,95 \times 10^{-7}$	POZ (6/6)	POZ	POZ
12	Benzil-butil-ftalat ⁽⁴⁾	85-68-7	POZ	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POZ	$1,98 \times 10^{-6}$	POZ (12/14)	POZ	NEG
13	Kortikosteron ⁽⁴⁾	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG (6/6)	NEG	NI
14	Kumestrol ⁽⁴⁾	479-13-0	POZ	$1,23 \times 10^{-9}$	$2,00 \times 10^{-8}$	POZ	$1,32 \times 10^{-7}$	POZ (30/30)	POZ	NI
15	Daidzein ⁽⁴⁾	486-66-8	POZ	$1,76 \times 10^{-8}$	$1,51 \times 10^{-7}$	POZ	$7,95 \times 10^{-7}$	POZ (39/39)	POZ	POZ
16	Dietilstilbestrol ⁽⁴⁾	56-53-1	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	POZ	$3,34 \times 10^{-11}$	POZ (42/42)	POZ	NI
17	Di-n-butil-ftalat	84-74-2	POZ	$4,09 \times 10^{-6}$		POZ	$4,09 \times 10^{-6}$	POZ (6/11)	POZ	NEG
18	Etil paraben	120-47-8	POZ	$5,00 \times 10^{-6}$	(bez PC ₅₀)	POZ	$2,48 \times 10^{-5}$	POZ		NI
19	Estron ⁽⁴⁾	53-16-7	POZ	$3,02 \times 10^{-11}$	$5,88 \times 10^{-10}$	POZ	$2,34 \times 10^{-10}$	POZ (26/28)	POZ	POZ
20	Genistein ⁽⁴⁾	446-72-0	POZ	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	POZ	$2,71 \times 10^{-7}$	POZ (100/102)	POZ	POZ

	Tvar	CAS br.	STTA test ⁽¹⁾			VM7Luc ER TA test ⁽²⁾		Izvor podataka za razvrstavanje ⁽⁴⁾		
			ER TA aktivnost	Vrijednost PC ₁₀ (M)	Vrijednost PC ₅₀ (M)	ER TA aktivnost	Vrijednost EC ₅₀ ^(b) , ⁽³⁾ (M)	Ostali ER TA- ovi ^(c)	Vezivanje ER-a	Uterotrofni
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NI
22	Kemferol ^(a)	520-18-3	POZ	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	POZ	$3,99 \times 10^{-6}$	POZ (23/23)	POZ	NI
23	Kepon ^(a)	143-50-0	POZ	$7,11 \times 10^{-7}$	$7,68 \times 10^{-6}$	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	POZ (14/18)	POZ	NI
24	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NI
25	Linuron ^(a)	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NI
26	Mezo-heksestrol ^(a)	84-16-2	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	POZ	$1,65 \times 10^{-11}$	POZ (4/4)	POZ	NI
27	Metil testosteron ^(a)	58-18-4	POZ	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POZ	$2,68 \times 10^{-6}$	POZ (5/6)	POZ	NI
28	Morin	480-16-0	POZ	$5,43 \times 10^{-7}$	$4,16 \times 10^{-6}$	POZ	$2,37 \times 10^{-6}$	POZ (2/2)	POZ	NI
29	Noretinodrel ^(a)	68-23-5	POZ	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	POZ	$9,39 \times 10^{-10}$	POZ (5/5)	POZ	NI
30	p,p'-metoksiklor ^(a)	72-43-5	POZ	$1,23 \times 10^{-6}$	(bez PC ₅₀) ^(b)	POZ	$1,92 \times 10^{-6}$	POZ (24/27)	POZ	POZ
31	Fenobarbital ^(a)	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NI

	Tvar	CAS br.	STTA test ⁽¹⁾			VM7Luc ER TA test ⁽²⁾		Izvor podataka za razvrstavanje ⁽⁴⁾		
			ER TA aktivnost	Vrijednost PC ₁₀ (M)	Vrijednost PC ₅₀ (M)	ER TA aktivnost	Vrijednost EC ₅₀ ⁽⁶⁾ , ⁽³⁾ (M)	Ostali ER TA- ovi ⁽⁵⁾	Vezivanje ER-a	Uterotrofni
32	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NI
33	Spiroinolakton ⁽⁴⁾	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NI
34	Testosteron	58-22-0	POZ	2,82 × 10 ⁻⁸	9,78 × 10 ⁻⁶	POZ	1,75 × 10 ⁻⁵	POZ (5/10)	POZ	NI

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; M = molarno; EC₅₀ = pola najveće učinkovite koncentracije ispitivane tvari; NEG = negativno; POZ = pozitivno; NI = nije ispitano; PC₁₀ (i PC₅₀) = koncentracija ispitivane tvari pri kojoj odgovor iznosi 10 % (ili 50 % za PC₅₀) odgovora koji inducira pozitivna kontrola (E2, 1nM) na svakoj ploči.

⁽⁴⁾ Uobičajene tvari ispitane u STTA i VM7Luc ER TA testovima koje su određene kao agonisti estrogenskih receptora ili negativne tvari i upotrijebljene za procjenu točnosti u validacijskoj studiji testa VM7Luc ER TA (ICCVAM-ovo evaluacijsko izvješće o testu VM7Luc ER TA, tablica 4-1 (3,)).

⁽⁶⁾ Najveća koncentracija ispitana bez ograničenja zbog citotoksičnosti ili netopljivosti bila je 1 × 10⁻⁵ M (STTA test) i 1 × 10⁻³ M (VM7Luc ER TA test).

⁽⁵⁾ Broj u zagradi označava rezultate ispitivanja razvrstane kao pozitivni (POZ) ili negativni (NEG) u odnosu na ukupni broj studija na koje se upućuje.

⁽¹⁾ Vrijednosti navedene u dokumentu *Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-Hela-9903 Cell Line* (2).

⁽²⁾ ICCVAM-ovo evaluacijsko izvješće o ispitnoj metodi LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): in vitro metoda za identifikaciju agonista i antagonista estrogenskih receptora (3).

⁽³⁾ Srednje vrijednosti EC₅₀ izračunane su s pomoću vrijednosti koje se naveli laboratoriji koji su provodili validacijsku studiju testa VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3).

⁽⁴⁾ Razvrstavanje kao agonist estrogenskog receptora ili negativna tvar temeljilo se na informacijama iz ICCVAM-ovih osnovnih dokumenata za preispitivanje (BRD; *Background Review Documents*) za ispitne metode vezivanja estrogenskih receptora i transaktivacije (31.) te informacijama dobivenima iz publikacija koje su objavljene i pregledane nakon dovršetka ICCVAM-ovih BRD-ova (2., 3., 18., 31., 33. i 34.).

Napomene: u svakom testu u okviru ove ispitne metode ne koriste se ista mjerenja. U nekim se situacijama ne može izračunati EC₅₀ jer nije generirana cijela krivulja doza i reakcija. Dok je u STTA testu vrijednost PC₁₀ ključno mjerenje, mogu postojati i drugi primjeri u kojima će PCx dati korisne informacije.

Tablica 2.

Usporedba rezultata iz STTA i VM7Luc ER TA testova za tvari ispitane u oba testa antagonista i razvrstane kao antagonisti estrogenskog receptora (POZ) ili negativne tvari (NEG)

	Tvar ^(a)	CAS br.	ER STTA test ⁽¹⁾		VM7Luc ER TA test ⁽²⁾ Mogući učinci testa		ER STTA ⁽⁴⁾	ICCVAM-ovo ⁽³⁾ sporazumno razvrstavanje Kemijski razred	prema MeSH-u ⁽⁶⁾	Razred proizvođača ⁽⁷⁾
			ER TA aktivnost	Vrijednost IC ₅₀ ^(b) (M)	ER TA aktivnost	Vrijednost IC ₅₀ ^(b) , ^(c) (M)				
1	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	POZ	$3,97 \times 10^{-9}$	POZ	$2,08 \times 10^{-7}$	umjereno POZ	POZ	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
2	Dibenzo[a,h]jantracen	53-70-3	POZ	Bez IC ₅₀	POZ	Bez IC ₅₀	POZ	PP	Policiklički spoj	Laboratorijska kemikalija, prirodni proizvod
3	Mifepriston	84371-65-3	POZ	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	—	Blago POZ	NEG	Steroid	Farmaceutski proizvod
4	Raloksifen HCl	82640-04-8	POZ	$7,86 \times 10^{-10}$	POZ	$1,19 \times 10^{-9}$	umjereno POZ	POZ	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
5	Tamoksifen	10540-29-1	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	POZ	$8,17 \times 10^{-7}$	POZ	POZ	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
6	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
7	Apigenin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterociklički spoj	Boja, prirodni proizvod, farmaceutski međuprodukt

	Tvar ⁽⁴⁾	CAS br.	ER STTA test ⁽¹⁾		VM7Luc ER TA test ⁽²⁾ Mogući učinci testa		ER STTA ⁽⁴⁾	ICCVAM-ovo ⁽³⁾ sporazumno razvrstavanje Kemijski razred	prema MeSH-u ⁽⁶⁾	Razred proizvođa ⁽⁷⁾
			ER TA aktivnost	Vrijednost IC ₅₀ ⁽⁶⁾ (M)	ER TA aktivnost	Vrijednost IC ₅₀ ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾ (M)				
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Heterociklički spoj	Herbicid
9	Di- <i>n</i> -butil-ftalat	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Ester, ftalna kiselina	Kozmetički sastojak, industrijska kemikalija, plastifikator
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	nije ispitano	PN	Heterociklički spoj, pirimidin	Fungicid
11	Flavon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
13	Genistein	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
14	<i>p</i> - <i>n</i> -nonilfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	nije ispitano	NEG	Fenol	Kemijski međuprodukt

	Tvar ⁽⁴⁾	CAS br.	ER STTA test ⁽¹⁾		VM7Luc ER TA test ⁽²⁾ Mogući učinci testa		ER STTA ⁽⁴⁾	ICCVAM-ovo ⁽³⁾ sporazumno razvrstavanje Kemijski razred	prema MeSH-u ⁽⁶⁾	Razred proizvođača ⁽⁷⁾
			ER TA aktivnost	Vrijednost IC ₅₀ ⁽⁶⁾ (M)	ER TA aktivnost	Vrijednost IC ₅₀ ⁽⁶⁾ ⁽³⁾ (M)				
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Ugljikovodik (ciklički)	Prirodni proizvod

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; M = molarno; IC₅₀ = pola najveće inhibitorne koncentracije ispitivane tvari; NEG = negativno; PN = pretpostavlja se da je negativno; POZ = pozitivno; PP = pretpostavlja se da je pozitivno.

⁽⁴⁾ Uobičajene tvari ispitane u STTA i VM7Luc ER TA testovima koje su određene kao antagonisti estrogenskih receptora ili negativne tvari i upotrijebljene za procjenu točnosti u validacijskoj studiji testa VM7Luc ER TA (2. i 3.).

⁽⁶⁾ Najveća koncentracija ispitana bez ograničenja zbog citotoksičnosti ili netopljivosti bila je 1×10^{-3} M (STTA test) i 1×10^{-5} M (VM7Luc ER TA test).

⁽¹⁾ Validacijsko izvješće o testu transkripcijske aktivacije sa stabilnom transfekcijom za otkrivanje aktivnosti posredovane estrogenskim receptorima, dio B (2.).

⁽²⁾ ICCVAM-ovo evaluacijsko izvješće o ispitnoj metodi LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA); *in vitro* metoda za identifikaciju agonista i antagonista estrogenskih receptora (3.).

⁽³⁾ Srednje vrijednosti IC₅₀ izračunane su s pomoću vrijednosti koje se naveli laboratoriji koji su provodili validacijsku studiju testa VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyooshi) (3.).

⁽⁴⁾ ER STTA aktivnost koja se očekuje na temelju njihovih učinaka koji su već prijavljeni i poznati iz prijašnjih podataka CERL-ja o testu vezivanja na estrogenske receptore, iz uterotrofnog testa i informacija prikupljenih iz objavljene literature (2.).

⁽⁵⁾ Razvrstavanje kao antagonist estrogenskih receptora ili negativna tvar temeljilo se na informacijama iz ICCVAM-ovih osnovnih dokumenata za preispitivanje (BRD; *Background Review Documents*) za testove vezivanja estrogenskih receptora i transaktivacije (31.) te informacijama dobivenima iz publikacija koje su objavljene i pregledane nakon dovršetka ICCVAM-ovih BRD-ova (2., 3., 18. i 31.).

⁽⁶⁾ Tvari su raspoređene u jedan kemijski razred ili više njih primjenom oznaka medicinskog nazivlja američke Nacionalne medicinske knjižnice (MeSH) – međunarodno priznate standardne sheme razvrstavanja (dostupno na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽⁷⁾ Tvari su raspoređene u jedan razred proizvoda ili više njih primjenom baze podataka o opasnim tvarima američke Nacionalne medicinske knjižnice (dostupno na <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

SASTAVNICE ER TA TESTA

Ključne sastavnice testa

11. Ova ispitna metoda primjenjuje se na testove u kojima se upotrebljava model stabilno transficiranog ili endogenog receptora ER α i stabilno transficiranog reporterskog gena koje kontrolira jedan element odgovora estrogena ili više njih; međutim, mogu biti prisutni i drugi receptori kao što je ER β . To su ključne sastavnice testa.

Kontrole

12. Treba opisati osnovu za predložene istodobne referentne norme za svaki test agonista i antagonista. Istodobne kontrole (negativna, otapalo i pozitivna), prema potrebi, znak su da test djeluje u ispitnim uvjetima i osnova su za usporedbe među pokusima; obično su dio kriterija prihvatljivosti za određeni pokus (1.).

Standardni postupci kontrole kvalitete

13. Standardne postupke kontrole kvalitete treba provoditi kako je opisano za svaki test kako bi se osiguralo da stanična linija ostane stabilna tijekom višestrukih pasaža, da ne sadržava mikoplazme (tj. nije kontaminirana bakterijama) i da zadrži sposobnost da tijekom vremena daje očekivane odgovore posredovane estrogenskim receptorima. Stanične linije nadalje bi trebalo provjeriti u pogledu točnog identiteta i ostalih kontaminanata (npr. gljivice, kvasac i virusi).

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

14. Prije ispitivanja nepoznatih kemikalija primjenom bilo kojeg od testova u okviru ove ispitne metode, svaki laboratorij treba dokazati osposobljenost za primjenu testa. Kako bi dokazao osposobljenost, svaki bi laboratorij trebao ispitati 14 tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u tablici 3. za test agonista i 10 tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz tablice 4. za test antagonista. To ispitivanje osposobljenosti potvrdit će i osjetljivost ispitnog sustava. Popis tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti podskup je referentnih tvari koje su navedene u zahtjevima izvedbe za ER TA testove (6.). Te su tvari komercijalno dostupne, čine razrede kemikalija koji se obično povezuju s aktivnošću agonista ili antagonista estrogenskih receptora, pokazuju primjeren raspon jakosti koji se očekuje za agoniste/antagoniste estrogenskih receptora (tj. slabi do jaki) i uključuju negativne tvari. Ispitivanje tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti treba se ponoviti barem dvaput na različite dane. Osposobljenost se dokazuje točnim razvrstavanjem (pozitivno/negativno) svake tvari za dokazivanje osposobljenosti. Pri učenju testova svaki tehničar treba dvaput ponoviti ispitivanje osposobljenosti. Ovisno o vrsti stanica neke se od tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti mogu ponašati kao SERM-ovi i pokazivati aktivnosti i kao agonisti i antagonisti. Međutim, tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti u tablicama 3. i 4. razvrstane su prema poznatoj dominantnoj aktivnosti koja bi se trebala koristiti za procjenu osposobljenosti.
15. Kako bi se dokazala uspješnost i u svrhe kontrole kvalitete svaki bi laboratorij trebao izraditi bazu podataka prijašnjih agonista i antagonista s podacima o referentnoj normi (npr. 17 β -estradiol i tamoksifen), pozitivnim i negativnim kontrolnim kemikalijama i kontroli s otapalom (npr. DMSO). Za početak, bazu podataka treba izraditi iz najmanje deset neovisnih ciklusa ispitivanja agonista (npr. 17 β -estradiola) i deset neovisnih ciklusa ispitivanja antagonista (npr. tamoksifena). Rezultate iz budućih analiza tih referentnih normi i kontrola s otapalom treba dodati kako bi se povećala baza podataka i osigurala dosljednost i uspješnost laboratorija u provedbi biotestova tijekom vremena.

Tablica 3.
Popis (14) tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za test agonista ⁽⁸⁾

Br. ⁽⁷⁾	Tvar	CAS br.	Predviđeni odgovor ⁽¹⁾	STTA test			VM7Luc ER TA test		Kemijski razred prema MeSH-u ⁽⁵⁾	Razred proizvoda ⁽⁶⁾
				Vrijednost PC ₁₀ (M) ⁽²⁾	Vrijednost PC ₅₀ (M) ⁽²⁾	Raspon ispitnih konc. (M)	Vrijednost EC ₅₀ u VM7Luc (M) ⁽³⁾	Najviša konc. za studiju o utvrđivanju raspona (M) ⁽⁴⁾		
14	Dietilstilbestrol	56-53-1	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3,34 \times 10^{-11}$	$3,73 \times 10^{-4}$	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
12	17 α -estradiol	57-91-0	POZ	$4,27 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-9}$	$3,67 \times 10^{-3}$	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
15	Mezo-heksestrol	84-16-2	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-11}$	$3,70 \times 10^{-3}$	Ugljikovodik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
11	4-tert-oktilfenol	140-66-9	POZ	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,19 \times 10^{-8}$	$4,85 \times 10^{-3}$	Fenol	Kemijski međuprodukt
9	Genistein	446-72-0	POZ	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,71 \times 10^{-7}$	$3,70 \times 10^{-4}$	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
6	Bisfenol A	80-05-7	POZ	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5,33 \times 10^{-7}$	$4,38 \times 10^{-3}$	Fenol	Kemijski međuprodukt

Br. (7)	Tvar	CAS br.	Predviđeni odgovor (1)	STTA test			VM7Luc ER TA test		Kemijski razred prema MeSH-u (5)	Razred proizvoda (6)
				Vrijednost PC ₁₀ (M) (2)	Vrijednost PC ₅₀ (M) (2)	Raspon ispitnih konc. (M)	Vrijednost EC ₅₀ u VM7Luc (M) (3)	Najviša konc. za studiju o utvrđivanju raspona (M) (4)		
2	Kemferol	520-18-3	POZ	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,99 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-3}$	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod
3	Benzil-butil-ftalat	85-68-7	POZ	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,98 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-4}$	Karboksilna kiselina, ester, ftalna kiselina	Plastifikator, industrijska kemikalija
4	<i>p,p'</i> -metoksiklor	72-43-5	POZ	$1,23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-3}$	Ugljikovodik (halogenirani)	Pesticid, veterinarski proizvod
1	Etil paraben	120-47-8	POZ	$5,00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,48 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-3}$	Karboksilna kiselina, fenol	Farmaceutski proizvod, konzervans
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	—	$10^{-10} - 10^{-4}$	—	$4,64 \times 10^{-4}$	Heterociklički spoj	Herbicid
20	Spirolakton	52-01-7	NEG	—	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	—	$2,40 \times 10^{-3}$	Lakton, steroid	Farmaceutski proizvod

Br. (7)	Tvar	CAS br.	Predviđeni odgovor (1)	STTA test			VM7Luc ER TA test		Kemijски razred prema MeSH-u (5)	Razred proizvoda (6)
				Vrijednost PC ₁₀ (M) (2)	Vrijednost PC ₅₀ (M) (2)	Raspon ispitnih konc. (M)	Vrijednost EC ₅₀ u VM7Luc (M) (2)	Najviša konc. za studiju o utvrđivanju raspona (M) (4)		
21	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	10 ⁻¹¹ – 10 ⁻⁵	—	9,41 × 10 ⁻⁵	Heterociklički spoj	Farmaceutski proizvod
22	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	10 ⁻¹¹ – 10 ⁻⁵	—	1,64 × 10 ⁻³	Heterociklički spoj, indol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; EC₅₀ = pola najveće učinkovite koncentracije ispitivane tvari; NEG = negativno; PC₁₀ (i PC₅₀) = koncentracija ispitivane tvari pri kojoj odgovor iznosi 10 % (ili 50 % za PC₅₀) odgovora koji inducira pozitivna kontrola (E2, 1nM) na svakoj ploči.

(1) Razvrstavanje kao pozitivno ili negativno u pogledu aktivnosti agonista estrogenskih receptora temeljilo se na ICCVAM-im osnovnim dokumentima za preispitivanje (BRD) za testove vezivanja estrogenskih receptora i transaktivacije (31.) te empirijskim podacima i drugim informacijama dobivenima iz studija na koje se upućuje koje su objavljene i pregledane nakon dovršetka ICCVAM-ovih BRD-ova (2., 3., 18., 31., 32., 33. i 34.).

(2) Vrijednosti navedene u dokumentu *Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-Hela-9903 Cell Line* (30.).

(3) Srednje vrijednosti EC₅₀ izračunane su s pomoću vrijednosti koje se naveli laboratoriji koji su provodili validacijsku studiju testa VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3.).

(4) Navedene koncentracije bile su najveće koncentracije ispitane (studija o utvrđivanju raspona) tijekom validacije testa VM7Luc ER TA. Ako su se koncentracije iz različitih laboratorija razlikovale, navedena je najveća koncentracija. Vidjeti tablicu 4-10 ICCVAM-ova evaluacijskog izvješća o ispitnoj metodi; ispitna metoda LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA); *in vitro* test za identifikaciju agonističkog ili antagonističkog djelovanja kemikalije na ljudski estrogenski receptor (3.).

(5) Tvari su raspoređene u jedan kemijski razred ili više njih primjenom oznaka medicinskog nazivlja američke Nacionalne medicinske knjižnice (MeSH) – međunarodno priznate standardne sheme razvrstavanja (dostupno na: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/>).

(6) Tvari su raspoređene u jedan razred proizvoda ili više njih primjenom baze podataka o opasnim tvarima američke Nacionalne medicinske knjižnice (dostupno na: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSD8>).

(7) Iz tablice 1. (Opis referentnih kemikalija (22.) za procjenu točnosti agonista estrogenskog receptora) zahtjeva izvedbe (6.).

(8) Ako tvar za dokazivanje tehničke osposobljenosti više nije komercijalno dostupna, može se upotrijebiti tvar koja je jednako razvrstana te je usporedive jakosti, načina djelovanja i kemijskog razreda.

Tablica 4.
Popis (10) tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za test antagonista

	Tvar ⁽⁴⁾	CAS br.	ER STTA test ⁽¹⁾			VM7Luc ER TA test ⁽²⁾			Mogući učinci testa ER STTA ⁽¹⁾	ICCVAM-ovo ⁽⁵⁾ sporazumno razvrstavanje	Kemijski razred prema MeSH-u ⁽⁶⁾	Razred proizvođača ⁽⁷⁾
			ER TA aktivnost	IC ₅₀ (M)	Raspon ispitnih konc. (M)	ER TA aktivnost	IC ₅₀ ⁽³⁾ (M)	Najviša konc. za studiju o utvrđivanju raspona (M) ⁽⁴⁾				
1	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	POZ	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POZ	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	umjereno POZ	POZ	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
2	Raloksifen HCl	82640-04-8	POZ	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POZ	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	umjereno POZ	POZ	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
3	Tamoksifen	10540-29-1	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} - 10^{-5}$	POZ	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	POZ	POZ	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod
4	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	—	$3,67 \times 10^{-3}$	vjerojatno negativno ^(*)	PN	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
5	Apigenin	520-36-5	NEG	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	—	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterociklički spoj	Boja, prirodni proizvod, farmaceutski međuproizvod
6	Di-n-butilftalat	84-74-2	NEG	—	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	—	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, ftalna kiselina	Kozmetički sastojak, industrijska kemikalija, plastifikator

	Tvar ⁽⁴⁾	CAS br.	ER STTA test ⁽¹⁾			VM7Luc ER TA test ⁽²⁾			Mogući učinci testa ER STTA ⁽¹⁾	ICCVAM-ovo ⁽⁶⁾ sporazumno razvrstavanje	Kemijski razred prema MeSH-u ⁽⁶⁾	Razred proizvođača ⁽⁷⁾
			ER TA aktivnost	IC ₅₀ (M)	Raspon ispitnih konc. (M)	ER TA aktivnost	IC ₅₀ ⁽³⁾ (M)	Najviša konc. za studiju o utvrđivanju raspona (M) ⁽⁴⁾				
7	Flavon	525-82-6	NEG	—	10 ⁻⁸ – 10 ⁻³	NEG	—	4,50 × 10 ⁻⁴	vjerojatno negativno ^(*)	PN	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
8	Genistein	446-72-0	NEG	—	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁴	NEG	—	3,70 × 10 ⁻⁴	vjerojatno negativno ^(*)	NEG	Flavonoid, heterociklički spoj	Prirodni proizvod, farmaceutski proizvod
9	<i>p</i> -n-nomifl-nol	104-40-5	NEG	—	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁴	NEG	—	4,54 × 10 ⁻⁴	nije ispitano	NEG	Fenol	Kemijski međuprodukt
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	10 ⁻⁸ – 10 ⁻³	NEG	—	4,38 × 10 ⁻⁴	vjerojatno negativno ^(*)	NEG	Ugljikovodik (ciklički)	Prirodni proizvod

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; M = molarno; IC₅₀ = pola najveće inhibitorne koncentracije ispitivane tvari; NEG = negativno; PN = pretpostavlja se da je negativno; POZ = pozitivno.

^(*) Klasificirano kao negativno u skladu s pregledom literature (2).

⁽⁴⁾ Uobičajene tvari ispitane u STTA i VM7Luc ER TA testovima koje su određene kao antagonisti estrogenskih receptora ili negativne tvari i upotrijebljene za procjenu točnosti u validacijskoj studiji testa VM7Luc ER TA (2. i 3.).

⁽¹⁾ Validacijsko izvješće o testu transkripcijske aktivacije sa stabilnom transfekcijom za otkrivanje aktivnosti posredovane estrogenskim receptorima, dio B (2).

⁽²⁾ ICCVAM-ovo evaluacijsko izvješće o ispitnoj metodi LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA); *in vitro* metoda za identifikaciju agonista i antagonista estrogenskih receptora (3).

⁽³⁾ Srednje vrijednosti IC₅₀ izračunate su s pomoću vrijednosti koje se naveli laboratoriji koji su provodili validacijsku studiju testa VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM i Hiyoshi) (3.).

⁽⁴⁾ Navedene koncentracije bile su najviše koncentracije ispitane (studija o utvrđivanju raspona) tijekom validacije testa VM7Luc ER TA. Ako su se koncentracije iz različitih laboratorija razlikovale, navedena je najveća koncentracija. Vidjeti tablicu 4-11 ICCVAM-ova evaluacijskog izvješća o ispitnoj metodi; ispitna metoda LUMI-Cell[®]ER (VM7Luc ER TA); *in vitro* test za identifikaciju agonističkog ili antagonističkog djelovanja kemikalije na ljudski estrogenski receptor (3.).

⁽⁵⁾ Razvrstavanje kao antagonist estrogenskih receptora ili negativna tvar temeljilo se na informacijama iz ICCVAM-ih osnovnih dokumenata za preispitivanje (BRD) za ispitne metode vezivanja estrogenskih receptora i transaktivacije (31.) te informacijama dobivenima iz publikacija koje su objavljene i pregledane nakon dovršetka ICCVAM-ovih BRD-ova (2., 3., 18. i 31.).

⁽⁶⁾ Tvari su raspoređene u jedan kemijski razred ili više njih primjenom oznaka medicinske knjižnice (MeSH) – međunarodno priznate standardne sheme razvrstavanja (dostupno na <http://www.nlm.nih.gov/mesh/>).

⁽⁷⁾ Tvari su raspoređene u jedan razred proizvoda ili više njih primjenom baze podataka o opasnim tvarima američke Nacionalne medicinske knjižnice (dostupno na <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/isis/htmlgen?HSDb>).

Kriteriji prihvatljivosti ciklusa ispitivanja

16. Prihvaćanje ili odbijanje ciklusa ispitivanja temelji se na procjeni rezultata dobivenih za referentne norme i kontrole koje se koriste za svaki pokus. Vrijednosti za PC_{50} (EC_{50}) ili IC_{50} za referentne norme trebaju ispunjavati kriterije prihvatljivosti kako su predviđeni za odabrani test (za STTA vidjeti Dodatak 2., za VM7Luc ER TA vidjeti Dodatak 3.) i sve pozitivne/negativne kontrole trebale bi se točno razvrstati za svaki prihvaćeni pokus. Sposobnost dosljedne provedbe testa treba dokazati razvojem i održavanjem baze s prijašnjim podacima za referentne norme i kontrole (vidjeti stavak 15.). Kao mjera obnovljivosti unutar jednog laboratorija mogu se koristiti standardne devijacije (SD) ili koeficijenti varijacije (CV) za srednje vrijednosti parametara prilagođavanja krivulje referentnih normi. Osim toga, treba ispuniti sljedeća načela u pogledu kriterija prihvatljivosti:

- potrebno je dovoljno podataka za kvantitativnu procjenu aktivacije (za test agonista) ili potiskivanja (za test antagonista) estrogenskog receptora (tj. učinkovitost i jakost),
- srednja reporterska aktivnost za referentnu koncentraciju referentnog estrogena treba biti barem minimum utvrđen u testovima u odnosu na aktivnost kontrole s nosačem (otapalom) kako bi se osigurala primjerena osjetljivost. Za STTA i VM7Luc ER TA testove to je četiri puta više od srednje kontrole s nosačem na svakoj ploči,
- ispitane koncentracije trebale bi biti unutar područja topljivosti ispitivanih kemikalija i ne bi smjele pokazivati citotoksičnost.

Analiza podataka

17. Za razvrstavanje pozitivnih i negativnih odgovora treba upotrebljavati utvrđeni postupak za tumačenje podataka za svaki test.
18. Ispunjavanje kriterija prihvatljivosti (stavak 16.) znači da test pravilno funkcionira, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni ciklus ispitivanja dati točne rezultate. Ponavljanje rezultata prvog ciklusa najbolji je znak toga da su dobiveni točni podaci. Ako se u dva ciklusa dobiju ponovljivi rezultati (npr. rezultati u oba ciklusa ispitivanja pokazuju da je ispitivana kemikalija pozitivna), ne treba provoditi treći ciklus.
19. Ako se u dva ciklusa ne dobiju ponovljivi rezultati (npr. ispitivana kemikalija pozitivna je u jednom ciklusu, a negativna u drugom) ili ako je potreban veći stupanj sigurnosti u pogledu ishoda testa, treba provesti najmanje tri neovisna ciklusa. U tom se slučaju razvrstavanje temelji na dva sukladna rezultata od tri.

Opći kriteriji za tumačenje podataka

20. Trenutačno ne postoji općeprihvaćena metoda za tumačenje ER TA podataka. Međutim, i kvalitativne (npr. pozitivno/negativno) i/ili kvantitativne (npr. EC_{50} , PC_{50} , IC_{50}) procjene aktivnosti posredovane estrogenskim receptorima trebaju se temeljiti na empirijskim podacima i valjanoj znanstvenoj prosudbi. Ako je moguće, pozitivne rezultate treba karakterizirati razmjer učinka u usporedbi s kontrolom nosača (otapala) ili referentnim estrogenom te koncentracija pri kojoj se javlja učinak (npr. EC_{50} , PC_{50} , RPC_{Max} , IC_{50} itd.).

Izješće o ispitivanju

21. Izješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Test:

- korišteni test,
- kontrolna/referentna norma/ispitivana kemikalija,
- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,

- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako su poznate,
- izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u mediju za uzgoj kulture u koju je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Otapalo/nosač:

- karakterizacija (priroda, dobavljač i serija),
- obrazloženje za odabir otapala/nosača,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču, ako su poznate.

Stanice:

- vrsta i izvor stanica:
 - je li estrogenski receptor izražen endogeno? Ako nije, koji su receptori transficirani,
 - korišteni konstrukti reporterskih gena (uključujući izvornu vrstu),
 - metoda transfekcije,
 - metoda odabira za održavanje stabilne transfekcije (ako je primjenjivo),
 - je li metoda transfekcije relevantna za stabilne linije,
- Broj pasaža stanica (od odmrzavanja),
- Broj pasaža stanica pri odmrzavanju,
- metode održavanja staničnih kultura.

Ispitni uvjeti:

- ograničenja topljivosti,
- opis metoda primijenjenih za procjenu vijabilnosti,
- sastav medija, koncentracija CO₂,
- koncentracije ispitivane kemikalije,
- volumen dodanog nosača i ispitivane kemikalije,
- temperatura i vlažnost inkubacije,
- trajanje tretiranja,
- gustoća stanica na početku i za vrijeme tretiranja,
- pozitivne i negativne referentne norme,
- reporterski reagensi (naziv proizvoda, dobavljač i serija),
- kriteriji na temelju kojih se ciklusi ispitivanja smatraju pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

Provjera prihvatljivosti:

- multiplikacijski faktori indukcije za svaku ploču testa i ispunjavaju li najmanju vrijednost za test na temelju prijašnjih kontrola,
- stvarne vrijednosti za kriterije prihvatljivosti, npr. log₁₀EC₅₀, log₁₀PC₅₀, logIC₅₀ i vrijednosti Hillova nagiba za istodobne pozitivne kontrole/referentne norme.

Rezultati:

- neobrađeni i normirani podaci,
- najveća razina multiplikacijskog faktora indukcije,
- podaci o citotoksičnosti,
- ako postoji, najniža učinkovita koncentracija (LEC),
- vrijednosti RPC_{Max}, PC_{Max}, PC₅₀, IC₅₀ i/ili EC₅₀, prema potrebi,
- odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,

- statističke analize, ako postoje, te mjera pogreške i pouzdanosti (npr. SEM, SD, CV ili interval 95-postotne pouzdanosti) te opis načina na koji se došlo do tih vrijednosti.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

1. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
3. ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
4. Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer. Res.*, 58(23): str. 5367.–73.
5. Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research*, 13(1): str. 67.–82.
6. OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
7. OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
8. OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
9. Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: str. 20.–6.
10. Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer*, 16(4): str. 1073.–89.
11. Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): str. 63.–6.
12. Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, *Journal of Chromatography B*, 777(1-2): str. 179.–189.

13. Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol. Sci.*, 89(1): str. 173.–187.
14. Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, *Toxicology Letters*, 126(2): str. 91.–98.
15. Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 28(1): str. 81.–118.
16. Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10): str. 1459.–69.
17. Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol. Lett.*, 102-103, 677.–680.
18. EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.
19. ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
20. Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor β - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, *Journal of Endocrinology*, 163(3): str. 379.–383.
21. Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor β (hER β) and its Heterodimerization with ER α *In Vivo* and *In Vitro*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(1): str. 122.–126.
22. Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor β -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12): str. 4258.–4265.
23. Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299(2): str. 204.–211.
24. Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, *Mol. Pharmacol.*, 54(1): str. 105.–12.
25. Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor- β : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9): str. 1703.–1714.
26. Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, *Experimental Biology and Medicine*, 230(8): str. 558.–568.
27. Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48(6): str. 1460.–1468.
28. Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, *Journal of Steroid Biochemistry*, 3(3): str. 515.–522.
29. Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, *Recent Progress in Hormone Research*, 24: str. 45.–80.

30. Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 56(3): str. 547.–569.
31. ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).
32. Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, *Environ. Health Persp.*, 109:785.–94.
33. Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1530.–1549.
34. Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1550.–1558.
35. Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280.–288.
36. Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649.–654.
37. Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072.–2081.
38. Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67.–82.

Dodatak 1.

DEFINICIJE I KRATICE

Kriteriji prihvatljivosti: minimalne norme za provedbu eksperimentalnih kontrola i referentnih normi. Da bi se pokus smatrao valjanim, trebali bi biti ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti.

Točnost (podudarnost): stupanj podudarnosti između rezultata testa i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti testa i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda testa (1.).

Agonist: tvar koja daje odgovor, npr. transkripciju, kada se veže na specifični receptor.

Antagonist: vrsta liganda na receptor ili kemikalije koja sama po sebi ne izaziva biološki odgovor nakon vezivanja na receptor, ali blokira ili ublažava odgovore posredovane agonistima.

Antiestrogeno djelovanje: sposobnost kemikalije da potiskuje djelovanje 17β -estradiola kojim se posreduje preko estrogenskog receptora.

Morfologija stanica: oblik i izgled stanica uzgojenih u monosloju jedne jažice ploče s kulturom tkiva. Stanice koje umiru često pokazuju abnormalnu morfologiju stanica.

CF: OECD-ov konceptualni okvir za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija.

Tretiranje ugljenom/dekstranom: tretiranje seruma koji se koristi u staničnoj kulturi. Tretiranjem ugljenom/dekstranom (koje se često naziva „stripiranje”) uklanjaju se endogeni hormoni i proteini koji vežu hormone.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Citotoksičnost: štetni učinci na staničnu strukturu ili funkciju koji naposljetku mogu uzrokovati smrt stanice i mogu se odraziti u smanjenju broja stanica prisutnih u jažici na kraju razdoblja izlaganja ili smanjenje kapaciteta za mjeru stanične funkcije u usporedbi s istodobnom kontrolom s nosačem.

CV: koeficijent varijacije.

DCC-FBS: fetalni goveđi serum tretiran ugljenom premazanim dekstranom.

DMEM: Dulbeccov modificirani Eagleov medij.

DMSO: dimetilsulfoksid.

E2: 17β -estradiol.

EC₅₀: pola najveće učinkovite koncentracije ispitivane kemikalije.

ED: endokrina disrupcija.

hER α : ljudski estrogenski receptor alfa.

hER β : ljudski estrogenski receptor beta.

EFM: medij bez estrogena. Dulbeccov modificirani Eagleov medij (DMEM) obogaćen s 4,5 % FBS-a tretiranog ugljenom premazanim dekstranom, 1,9 % L-glutamina i 0,9 % mješavine penicilina i streptomicina.

ER: estrogenski receptor.

ERE: element odgovora estrogena.

Estrogeno djelovanje: sposobnost kemikalije da oponaša 17 β -estradiol u pogledu sposobnosti da se veže na estrogenske receptore i da ih aktivira. Ovom se ispitnom metodom može otkriti estrogeno djelovanje posredovano receptorom hER α .

ERTA: transaktivacija estrogenskog receptora.

FBS: fetalni goveđi serum.

HeLa: imortalizirana stanična linija humanog cervikalnog karcinoma.

HeLa9903: podklon stanice HeLa u koji su stabilno transficirani hER α i reporterski gen za luciferazu.

IC₅₀: pola najveće učinkovite koncentracije inhibitorne ispitivane kemikalije.

ICCVAM: Međuagencijski koordinacijski odbor za validaciju alternativnih metoda (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods).

Obnovljivost između laboratorija: mjera u kojoj različiti kvalificirani laboratoriji mogu dobiti kvalitativno i kvantitativno slične rezultate primjenom istog protokola i ispitivanjem istih tvari. Obnovljivost između laboratorija utvrđuje se tijekom predvalidacijskih i validacijskih procesa te pokazuje mjeru u kojoj se test može uspješno prenositi među laboratorijima, a poznata je i kao interlaboratorijska obnovljivost (1.).

Obnovljivost unutar laboratorija: utvrđivanje mjere u kojoj kvalificirane osobe u istom laboratoriju mogu uspješno ponoviti rezultate primjenom specifičnog protokola u različito vrijeme. Poznata je i kao intralaboratorijska obnovljivost (1.).

LEC: najniža učinkovita koncentracija najniža je koncentracija ispitivane kemikalije koja dovodi do odgovora (tj. najniža koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je multiplikacijski faktor indukcije statistički različit od istodobne kontrole s nosačem).

I ja također test: kolokvijalni izraz za test koji je strukturno i funkcionalno sličan validiranoj i prihvaćenoj referentnoj ispitnoj metodi. Izraz se često koristi u istom značenju kao slična ispitna metoda.

MT: metalotionein.

MMTV: virus mišjeg tumora dojke.

OHT: 4-hidroksitamoksifen.

PBTG: smjernica za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti.

PC (pozitivna kontrola): jako aktivna tvar, po mogućnosti 17β -estradiol, koja se uključuje u sva ispitivanja kako bi se pomoglo osigurati pravilno funkcioniranje testa.

PC₁₀: koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj izmjerena aktivnost u testu agonista iznosi 10 % maksimalne aktivnosti koju inducira pozitivna kontrola (1 nM E2 za STTA test) na svakoj ploči.

PC₅₀: koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj izmjerena aktivnost u testu agonista iznosi 50 % maksimalne aktivnosti koju inducira pozitivna kontrola (E2 u referentnoj koncentraciji utvrđenoj u ispitnoj metodi) na svakoj ploči.

PC_{Max}: koncentracija ispitivane kemikalije koja inducira RPC_{Max}

Zahtjevi izvedbe: zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Oni obuhvaćaju: 1. ključne elemente testa; 2. minimalni popis referentnih kemikalija odabranih između kemikalija koje se koriste za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode, i 3. slične razine točnosti i pouzdanosti, utemeljene na rezultatima dobivenim za validiranu ispitnu metodu, koje se prilikom ocjenjivanja trebaju dokazati predloženim testom koristeći minimalni popis referentnih kemikalija (1.).

Tvari za dokazivanje osposobljenosti: podskupina referentnih tvari iz zahtjeva izvedbe kojima se laboratoriji mogu koristiti kako bi dokazali tehničku osposobljenost za provođenje standardizirane ispitne metode. Kriteriji za odabir tih tvari obično uključuju to da predstavljaju cijeli raspon odgovora, da su komercijalno dostupni i da su za njih dostupni visokokvalitetni referentni podaci.

Osposobljenost: dokazana sposobnost za pravilno provođenje testa prije ispitivanja nepoznatih tvari.

Referentni estrogen (pozitivna kontrola, PC): 17β -estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referentna norma: referentna tvar koja se upotrebljava za dokazivanje primjerenosti testa. 17β -estradiol referentna je norma za STTA i VM7Luc ER TA testove.

Referentne ispitne metode: testovi na kojima se temelji PBTG 455.

Relevantnost: opis odnosa između testa i istraživanog učinka te je li test prikladan i koristan za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri testom točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) testa (1.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri test može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija.

RLU: relativne jedinice svjetlosti.

RNK: ribonukleinska kiselina.

RPC_{Max}: maksimalna razina odgovora koju inducira ispitivana kemikalija, izražena kao postotak odgovora koji inducira 1 nM E2 na istoj ploči.

RPMI: medij RPMI 1 640 obogaćen s 0,9 % mješavine penicilina i streptomicina te 8,0 % fetalnog goveđeg seruma (FBS).

Ciklus: pojedinačni pokus kojim se ocjenjuje kemijsko djelovanje na temelju biološkog ishoda testa. Svaki je ciklus potpuni pokus koji se provodi na jažicama s ponavljanjem sa stanicama koje se istodobno nasaduju iz zajedničke banke stanica.

Neovisni ciklus: zaseban, neovisan pokus kojim se ocjenjuje kemijsko djelovanje na temelju biološkog ishoda testa, upotrebom stanica iz različite banke i svježih razrijeđenih kemikalija, koji se provodi na različite dane ili ih provode različiti članovi osoblja na isti dan.

SD: standardna devijacija.

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih tvari koje su pravilno razvrstane primjenom testa. To je mjera točnosti za test koji daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti testa (1.).

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih tvari koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti za test koji daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti testa (1.).

Stabilna transfekcija: kada se DNK transficira u uzgojene stanice tako da je stabilno integriran u genom stanica, što dovodi do stabilne ekspresije transficiranih gena. Klonovi stabilno transficiranih stanica odabiru se na temelju stabilnih markera (npr. otpornost na G418).

STTA test: test transaktivacije sa stabilnom transfekcijom, test transkripcijske aktivacije estrogenskog receptora a primjenom stanične linije HeLa 9 903.

Studija: sveukupni eksperimentalni rad koji se obavlja radi procjene pojedinačne, specifične tvari primjenom specifičnog testa. Studija obuhvaća sve korake, uključujući razrjeđivanja ispitne tvari u ispitnom mediju, preliminarne cikluse za određivanje raspona, sve potrebne iscrpne cikluse, analize podataka, osiguranje kvalitete, procjene citotoksičnosti itd. Dovršetak studije omogućuje razvrstavanje aktivnosti ispitivane kemikalije prema cilju toksičnosti (tj. aktivno, neaktivno ili nejednoznačno) koji se procjenjuje korištenim testom te procjenu jakosti u odnosu na pozitivnu referentnu kemikaliju.

Tvar: Na temelju Uredbe REACH ⁽¹⁾ tvar se definira kao kemijski element i njegovi spojevi u prirodnom stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, uključujući i dodatke (aditive) koji su nužni za održavanje stabilnosti te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenog postupka, ali isključujući otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari i promjene njezina sastava. Vrlo slična definicija koristi se i u kontekstu sustava UN GHS (1.).

TA (Transaktivacija): pokretanje sinteze molekula mRNA kao odgovor na specifični kemijski signal, kao što je vezivanje estrogena na estrogenski receptor.

Test: u kontekstu ove ispitne metode test je jedna od metodologija koje su prihvaćene kao valjane u pogledu ispunjavanja utvrđenih kriterija uspješnosti. Sastavnice testa uključuju, na primjer, specifičnu staničnu liniju s povezanim uvjetima rasta, specifični medij u kojem se provodi ispitivanje, uvjete postavljanja ploča, raspored i razrjeđenja ispitivanih kemikalija i sve ostale potrebne mjere za kontrolu kvalitete i povezane korake procjene podataka.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Transkripcija: sinteza molekula mRNA.

UVCB: kemijske tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Validirana ispitna metoda: test za koji su provedene validacijske studije za utvrđivanje relevantnosti (uključujući točnost) i pouzdanosti za specifičnu namjenu. Važno je napomenuti da validirana ispitna metoda možda neće biti u dovoljnoj mjeri uspješna s obzirom na točnost i pouzdanost da bi je se moglo smatrati prihvatljivom za predloženu namjenu (1.).

Validacija: proces kojim se utvrđuju pouzdanost i relevantnost određenog pristupa, metode, testa, procesa ili procjene za definiranu svrhu (1.)

VC (kontrola s nosačem): otapalo koje se upotrebljava za otapanje ispitnih i kontrolnih kemikalija ispituje se samo kao nosač, bez otopljene kemikalije.

VM7: imortalizirana stanica adenokarcinoma koja endogeno eksprimira estrogenski receptor.

VM7Luc4E2: Stanična linija VM7Luc4E2 izvedena je iz VM7 imortaliziranih humanih stanica adenokarcinoma koje endogeno ekspimiraju oba oblika estrogenskog receptora (ER α i ER β) i stabilno su transficirane plazmidom pGudLuc7.ERE. Taj plazmid sadržava četiri primjerka sintetičkog oligonukleotida koji sadržava element odgovora estrogena uzlazno od promotora virusa mišjeg tumora dojke (MMTV) i gen za luciferazu krijesnice.

Slaba pozitivna kontrola: slabo aktivna tvar odabrana s popisa referentnih kemikalija koja se uključuje u sva ispitivanja kako bi se pomoglo osigurati pravilno funkcioniranje testa.

⁽¹⁾ Uredba (EZ) br. 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća od 18. prosinca 2006. o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) i osnivanju Europske agencije za kemikalije te o izmjeni Direktive 1999/45/EZ i stavljanju izvan snage Uredbe Vijeća (EEZ) br. 793/93 i Uredbe Komisije (EZ) br. 1488/94 kao i Direktive Vijeća 76/769/EEZ i direktiva Komisije 91/155/EEZ, 93/67/EEZ, 93/105/EZ i 2000/21/EZ (SL L 304, 22.11.2007., str. 1.).

Dodatak 2.

TEST TRANSAKTIVACIJE STABILNO TRANSFICIRANOG LJUDSKOG ESTROGENSKOG RECEPTORA-A ZA OTKRIVANJE ESTROGENSKOG AGONISTIČKOG I ANTAGONISTIČKOG DJELOVANJA KEMIČALIJA PRIMJENOM STANIČNE LINIJE HERA-HELA-9903

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

1. U ovom testu transaktivacije (TA) upotrebljava se stanična linija hER α -HeLa-9 903 radi otkrivanja estrogenskog agonističkog djelovanja kojim posreduje ljudski estrogenski receptor alfa (hER α). Validacijska studija testa transaktivacije sa stabilnom transfekcijom (STTA) koju je proveo CERi (Japanski institut za procjenu i istraživanje kemikalija) primjenom stanične linije hER α -HeLa-9 903 za otkrivanje estrogenskog agonističkog i antagonističkog djelovanja kojim posreduje ljudski estrogenski receptor alfa (hER α) pokazala je relevantnost i pouzdanost testa za predviđenu svrhu (1.).
2. Ovaj je test posebno osmišljen za otkrivanje transaktivacije kojom posreduje hER α mjerenjem kemiluminiscencije kao krajnje točke. Međutim, pri koncentracijama fitoestrogena većima od 1 μ M zabilježeni su signali luminiscencije kojima ne posreduju receptori zbog pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu (2. i 3.). Iako krivulja doza – odgovor pokazuje da do stvarne aktivacije sustava estrogenskog receptora dolazi pri manjim koncentracijama, ekspresiju luciferaze dobivenu pri visokim koncentracijama fitoestrogena ili sličnih spojeva za koje se pretpostavlja da poput fitoestrogena dovode do pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu treba pažljivo ispitati sustavima ER TA testova sa stabilnom transfekcijom (Dodatak 1.).
3. Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „OPĆI UVOD” i „SASTAVNICE ER TA TESTA”. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj Smjernici za ispitivanje navedene su u Dodatku 2.1.

NAČELO TESTA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

4. Test se upotrebljava za signalizaciju vezivanja estrogenskog receptora s ligandom. Nakon vezivanja s ligandom kompleks receptora i liganda translocira u jezgru, gdje se veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen za luciferazu krijesnice, što dovodi do povećane stanične ekspresije enzima luciferaze. Luciferin je supstrat koji enzim luciferaze pretvara u bioluminiscentni proizvod koji se može kvantitativno izmjeriti s pomoću luminometra. Aktivnost luciferaze može se procijeniti brzo i jeftino primjenom nekoliko komercijalno dostupnih pribora za ispitivanje.
5. U ispitnom sustavu upotrebljava se stanična linija hER α -HeLa-9 903, koja se dobiva iz humanog cervikalnog tumora, s dva stabilno umetnuta konstrukta: i. konstruktom za ekspresiju hER α (kodiranje cijelog ljudskog receptora) i ii. konstruktom reporterskog gena za luciferazu krijesnice koji nosi pet tandemskih ponavljanja elementa vitelogenina koji reagira na estrogen (ERE) koje pokreće TATA element promotora gena za mišji metalotionein (MT). Pokazalo se da je mišji MT TATA genski konstrukt najuspješniji pa se često upotrebljava. Stoga ova stanična linija hER α -HeLa-9 903 može mjeriti sposobnost ispitivane kemikalije da inducira transaktivaciju genske ekspresije luciferaze kojom posreduje hER α .
6. U slučaju testa agonista estrogenskog receptora, tumačenje podataka temelji se na tome je li maksimalna razina odgovora koju inducira ispitivana kemikalija jednaka ili veća od odgovora agonista koji iznosi 10 % odgovora koji inducira koncentracija pozitivne kontrole 17 β -estradiola (E2) s najvećim učinkom (1 nM) (tj. PC10). U slučaju testa antagonista estrogenskog receptora, tumačenje podataka temelji se na tome pokazuje li odgovor smanjenje aktivnosti od najmanje 30 % u odnosu na odgovor koji inducira kontrola s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*) (25 pM E2) bez pojave citotoksičnosti. O analizi i tumačenju podataka podrobno se raspravlja u stavcima od 34. do 48.

POSTUPAK**Stanične linije**

7. Za test bi se trebala upotrebljavati stabilno transficirana stanična linija hER α -HeLa-9 903. Stanična linija može se dobiti iz banke stanica JCRB-a (Japanese Collection of Research Bioresources, Japanska zbirka istraživačkih bioresursa) ⁽¹⁾ nakon potpisivanja sporazuma o prijenosu materijala (MTA).
8. U ispitivanju se trebaju upotrebljavati samo stanice koje ne sadržavaju mikoplazmu. RT-PCR (lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu) preferirana je metoda za osjetljivo otkrivanje zaraze mikoplazmom (4., 5. i 6.).

Stabilnost stanične linije

9. Kako bi se pratila stabilnost stanične linije, kao referentne norme za test agonista treba upotrebljavati E2, 17 α -estradiol, 17 α -metilttestosteron i kortikosteron te treba izmjeriti cijelu krivulju koncentracija – odgovor u rasponu ispitne koncentracije navedenom u tablici 1. barem jednom kod svake provedbe testa, a rezultati bi se trebali slagati s rezultatima navedenima u tablici 1.
10. U slučaju testa antagonista, pri svakom ciklusu treba istodobno mjeriti cijele krivulje koncentracije za dvije referentne norme, tamoksifen i flutamid. Treba pratiti točno kvalitativno razvrstavanje tih dviju kemikalija kao pozitivnih i negativnih.

Stanična kultura i uvjeti nasadićivanja

11. Stanice treba održavati u Eagleovu minimalnom esencijalnom mediju (EMEM) bez fenolne crvene, obogaćenom sa 60 mg/l antibiotika kanamicina i 10 % fetalnog goveđeg seruma tretiranog ugljenom premazanom dekstranom (DCC-FBS), u inkubatoru CO₂ (5 % CO₂) na 37 $\pm$ 1 °C. Kada se postigne konfluencija od 75 do 90 %, može se uzgojiti supkultura po 10 ml 0,4 x 10⁵ – 1 x 10⁵ stanica/ml za zdjelicu sa staničnom kulturom od 100 mm. Stanice treba suspendirati u 10 % medija FBS-EMEM (što je isto kao i EMEM s DCC-FBS-om) i zatim nasaditi u jažice mikroploče pri gustoći od 1 x 10⁴ stanica/(100 μ l x jažica). Stanice zatim treba predinkubirati u inkubatoru s 5 % CO₂ na 37 $\pm$ 1 °C u trajanju od tri sata prije izlaganja kemikaliji. U plastičnoj opremi ne smije biti estrogene aktivnosti.
12. Kako bi se održao integritet odgovora, stanice treba uzgajati za više od jedne pasaže od zamrznute matične zalihe u kondicioniranom mediju i ne bi se trebale uzgajati za više od 40 pasaža. Za staničnu liniju hER α -HeLa-9 903 to će trajati manje od tri mjeseca. Međutim, uspješnost stanica može se smanjiti ako se one uzgajaju u uvjetima koji nisu primjereni za uzgoj kulture.
13. DCC-FBS se može pripremiti kako je opisano u Dodatku 2.2. ili se može nabaviti iz komercijalnih izvora.

Kriteriji prihvatljivosti*Pozitivne i negativne referentne norme za test agonista estrogenskog receptora*

14. Prije i tijekom provođenja studije treba potvrditi osjetljivost ispitnog sustava primjenom odgovarajućih koncentracija jakog estrogena: E2, slabog estrogena (17 α -estradiol), vrlo slabog agonista (17 α -metilttestosteron) i negativne tvari (kortikosteron). Vrijednosti prihvatljivog raspona izvedene iz validacijske studije (1.) navedene su u tablici 1. Ove četiri paralelne referentne norme treba uključiti u svaki pokus i rezultati bi trebali biti unutar prihvatljivih ograničenja. Ako nisu, treba utvrditi uzrok neispunjavanja kriterija prihvatljivosti (npr. rukovanje stanicama, serum i antibiotici za kvalitetu i koncentracija) te ponoviti test. Kada se ispune kriteriji prihvatljivosti, ključna je dosljedna

⁽¹⁾ JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan, faks: +81 726419812.

upotreba materijala za uzgoj stanica kako bi se osigurala minimalna varijabilnost vrijednosti EC₅₀, PC₅₀ i PC₁₀. S pomoću četiriju paralelnih referentnih normi, koje treba uključiti u svaki pokus (proveden u istim uvjetima, uključujući materijale, razinu pasaže stanica i tehničare), može se osigurati osjetljivost testa jer vrijednosti PC₁₀ triju pozitivnih referentnih normi trebaju biti unutar prihvatljivog raspona, isto kao i vrijednosti PC₅₀ i EC₅₀ ako se mogu izračunati (vidjeti tablicu 1.).

Tablica 1.

Vrijednosti prihvatljivog raspona četiriju referentnih normi za test agonista estrogenskog receptora

Naziv	logPC ₅₀	logPC ₁₀	logEC ₅₀	Hillov nagib	Raspon ispitivanja
17β-estradiol (E2) CAS br.: 50-28-2	-11,4 ~ -10,1	< -11	-11,3 ~ -10,1	0,7 ~ 1,5	10 ⁻¹⁴ ~ 10 ⁻⁸ M
17α-estradiol CAS br.: 57-91-0	-9,6 ~ -8,1	-10,7 ~ -9,3	-9,6 ~ -8,4	0,9 ~ 2,0	10 ⁻¹² ~ 10 ⁻⁶ M
Kortikosteron CAS br.: 50-22-6	—	—	—	—	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁴ M
17α-metiltestosteron CAS br.: 58-18-4	-6,0 ~ -5,1	-8,0 ~ -6,2	—	—	10 ⁻¹¹ ~ 10 ⁻⁵ M

Pozitivne i negativne referentne norme za test antagonista estrogenskog receptora

15. Prije i tijekom provođenja studije treba potvrditi osjetljivost ispitnog sustava primjenom odgovarajućih koncentracija pozitivne tvari (tamoksifen) i negativne tvari (flutamid). Vrijednosti prihvatljivog raspona izvedene iz validacijske studije (1.) navedene su u tablici 2. Ove dvije paralelne referentne norme treba uključiti u svaki pokus i rezultati bi trebali biti procijenjeni točnima, kako je prikazano u kriterijima. Ako nisu, treba utvrditi uzrok neispunjavanja kriterija (npr. rukovanje stanicama, serum i antibiotici za kvalitetu i koncentracija) te ponoviti test. Osim toga, treba izračunati vrijednosti IC₅₀ za pozitivnu tvar (tamoksifen) i rezultati bi trebali biti unutar utvrđenih prihvatljivih ograničenja. Kada se ispune kriteriji prihvatljivosti, ključna je dosljedna upotreba materijala za uzgoj stanica kako bi se osigurala minimalna varijabilnost vrijednosti IC₅₀. S pomoću tih dviju paralelnih referentnih normi, koje treba uključiti u svaki pokus (proveden u istim uvjetima, uključujući materijale, razinu pasaže stanica i tehničare), može se osigurati osjetljivost testa (vidjeti tablicu 2.).

Tablica 2.

Kriteriji i vrijednosti prihvatljivog raspona dviju referentnih normi za test antagonista estrogenskog receptora

Naziv	Kriteriji	LogIC ₅₀	Raspon ispitivanja
Tamoksifen CAS br.: 10 540-29-1	Pozitivno: treba izračunati IC ₅₀	-5,942 ~ -7,596	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M
Flutamid CAS br.: 13 311-84-7	Negativno: ne treba izračunati IC ₃₀	—	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M

Pozitivne kontrole i kontrole s nosačem

16. Pozitivnu kontrolu (PC) za test agonista estrogenskog receptora (1 nM E2) i za test antagonista estrogenskog receptora (10 μ M tamoksifena) treba ispitati najmanje u tri ponavljanja na svakoj ploči. Nosač koji se upotrebljava za otapanje ispitivane kemikalije treba ispitati kao kontrolu s nosačem (VC) barem u tri ponavljanja na svakoj ploči. Osim te kontrole s nosačem, ako se u pozitivnoj kontroli upotrebljava nosač različit od onoga koji se upotrebljava s ispitivanom kemikalijom, treba ispitati drugu kontrolu s nosačem u najmanje tri ponavljanja na istoj ploči s pozitivnom kontrolom.

Kriteriji kvalitete za test agonista estrogenskog receptora

17. Srednja aktivnost luciferaze u pozitivnoj kontroli (1 nM E2) treba biti barem četiri puta veća od srednje vrijednosti u kontroli s nosačem na svakoj ploči. Kriterij se utvrđuje na temelju pouzdanosti vrijednosti krajnjih točaka iz validacijske studije (prema prijašnjim podacima četiri do 30 puta više).
18. Kad je riječ o kontroli kvalitete testa, multiplikacijski faktor indukcije koji odgovara vrijednosti PC₁₀ istodobne pozitivne kontrole (1 nM E2) trebao bi biti veći od 1 + 2 standardne devijacije vrijednosti multiplikacijskog faktora indukcije (= 1) istodobne kontrole s nosačem. U svrhu određivanja prioriteta, vrijednost PC₁₀ može biti korisna za pojednostavljenje potrebne analize podataka u usporedbi sa statističkom analizom. Iako statistička analiza pruža podatke o značajnosti, ta analiza nije kvantitativan parametar u pogledu potencijala koji se temelji na koncentraciji i stoga je manje korisna u svrhu određivanja prioriteta.

Kriteriji kvalitete za test antagonista estrogenskog receptora

19. Srednja aktivnost luciferaze u kontroli s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*) (25 nM E2) treba biti barem četiri puta veća od srednje vrijednosti u kontroli s nosačem na svakoj ploči. Kriterij se utvrđuje na temelju pouzdanosti vrijednosti krajnjih točaka iz validacijske studije.
20. Kad je riječ o kontroli kvalitete testa, relativna transkripcijska aktivacija (RTA) 1 nM E2 treba biti veća od 100 %, RTA 1 μ M 4-hidroksitamoksifena (OHT) treba biti manji od 40,6 % i RTA 100 μ M digitonina (Dig) treba biti manji od 0 %.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija (vidjeti stavak 14. i tablice 3. i 4. u odjeljku „SASTAVNICE ER TA TESTA” ove ispitne metode).

Nosač

21. Kao istodobnu kontrolu s nosačem treba upotrijebiti dimetilsulfoksid (DMSO) ili primjereno otapalo, u istoj koncentraciji koja se upotrebljava za različite pozitivne i negativne kontrole i ispitivane kemikalije. Ispitivane kemikalije treba otopiti u otapalu koje otapa ispitivanu kemikaliju te se može miješati s medijem za stanice. Primjereni su nosači voda, etanol (čistoće od 95 % do 100 %) i DMSO. Ako se upotrebljava DMSO, ne bi se trebalo koristiti više od 0,1 % (v/v). Za sve bi nosače trebalo dokazati da najveći volumen koji se upotrebljava nije citotoksičan i da ne utječu na uspješnost testa.

Priprema ispitivanih kemikalija

22. Ispitivane kemikalije obično treba otopiti u DMSO-u ili drugom primjerenom otapalu i serijski razrijediti istim otapalom u omjeru 1: 10 kako bi se pripremile otopine za razrjeđivanje s medijem.

Topljivost i citotoksičnost: razmatranja o utvrđivanju raspona

23. Treba provesti preliminarno ispitivanje kako bi se utvrdio primjereni raspon koncentracije kemikalije koja se ispituje i kako bi se utvrdilo postoje li određeni problemi povezani s topljivosti i citotoksičnošću ispitivane kemikalije. Kemikalije se u početku ispituju do najveće koncentracije od 1 μ l/ml, 1 mg/ml ili 1 mM, ovisno o tome što je najmanje. Na temelju mjere citotoksičnosti ili nedovoljne topljivosti uočene u preliminarnom ispitivanju, u prvom definitivnom ciklusu kemikaliju treba ispitati po log-serijskim razrjeđenjima, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM, 100 μ M, 10 μ M itd.) i zabilježiti zamućenje, talog ili citotoksičnost. Koncentracije u drugom, a prema potrebi i trećem ciklusu treba po potrebi prilagoditi radi bolje karakterizacije krivulje koncentracija – odgovor i kako bi se izbjegle koncentracije za koje se utvrdi da nisu topljive ili da induciraju preveliku citotoksičnost.

24. Kod agonista i antagonista estrogenskog receptora prisutnost povećanih razina citotoksičnosti može znatno izmijeniti ili eliminirati uobičajeni sigmoidni odgovor i treba je uzeti u obzir pri tumačenju podataka. Treba upotrebljavati metode za ispitivanje citotoksičnosti koje mogu dati informacije o 80-postotnoj vijabilnosti stanica, uz primjenu primjerenog testa na temelju iskustva laboratorija.
25. Ako rezultati ispitivanja citotoksičnosti pokazuju da je koncentracija ispitivane kemikalije smanjila broj stanica za 20 % ili više, ta se koncentracija treba smatrati citotoksičnom, a koncentracije koje su jednake citotoksičnoj koncentraciji ili veće treba isključiti iz procjene.

Izlaganje kemikaliji i organizacija testne ploče

26. Postupak za razrjeđivanja kemikalija (koraci 1. i 2.) i izlaganje stanica (korak 3.) može se provoditi na sljedeći način.

Korak 1.: Svaku ispitivanu kemikaliju treba serijski razrijediti u DMSO-u ili primjerenom otapalu i dodati u jažice mikrotitracijske pločice kako bi se dobile konačne serijske koncentracije kako su utvrđene u preliminarnom ispitivanju za utvrđivanje raspona (obično u serijama, na primjer 1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM i 10 pM (10^{-3} – 10^{-11} M)) za ispitivanje u tri ponavljanja.

Korak 2.: razrjeđivanje kemikalija: prvo razrijediti 1,5 μ l ispitivane kemikalije u otapalu na volumen od 500 μ l medija.

Korak 3.: izlaganje stanica kemikaliji: dodati 50 μ l razrijeđene kemikalije s medijem (pripremljene u koraku 2.) u testnu jažicu koja sadržava 104 stanica/100 μ l/jažica.

Preporučeni konačni volumen medija potrebnog za svaku jažicu iznosi 150 μ l. Ispitni uzorci i referentne norme mogu se rasporediti kako je prikazano u tablici 3. i tablici 4.

Tablica 3.

Primjer rasporeda koncentracija na pločama za referentne norme na testnoj ploči za agonist estrogenskog receptora

Redak	17 α -metiltestosteron			Kortikosteron			17 α -estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2)

27. Referentne norme (E2, 17 α -estradiol, 17 α -metil testosteron i kortikosteron) treba ispitati u svakom ciklusu (tablica 3.). Jažice s pozitivnom kontrolom tretirane s 1 nM E2 koje mogu proizvesti najveću indukciju E2 te jažice s kontrolom nosača tretirane samo DMSO-om (ili primjerenim otapalom) treba uključiti u svaku testnu ploču u ispitivanju (tablica 4.). Ako se u istom pokusu upotrebljavaju stanice iz različitih izvora (npr. različiti broj pasaže, različita serija itd.), referentne norme trebaju se ispitati za svaki izvor stanica.

Tablica 4.

Primjer rasporeda koncentracija na pločama za ispitivane kemikalije i kemikalije za kontrolu na testnoj ploči u testu agonista estrogenskog receptora

Redak	Ispitivana kemikalija 1			Ispitivana kemikalija 2			Ispitivana kemikalija 3			Ispitivana kemikalija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	1 mM	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 μ M	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2)

Tablica 5

Primjer rasporeda koncentracija na pločama za referentne norme na testnoj ploči u testu antagonista estrogenskog receptora

Redak	Tamoksifen			Flutamid			Ispitivana kemikalija 1			Ispitivana kemikalija 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO-a	→	→	→	→	→	1 μ M OHT-a	→	→	100 μ M digitonina (Dig)	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2); OHT: 4-hidroksitamoksifena; Dig: digitonin.

 = dodano 25 pM E2

28. Kako bi se procijenilo antagonističko djelovanje kemikalija, u testne jažice koje se nalaze u recima od A do G treba dodati 25 pM E2. Referentne norme (tamoksifen i flutamid) treba ispitati u svakom ciklusu. Svaka testna ploča u ispitivanju treba uključivati jažice s pozitivnom kontrolom tretirane s 1 nM E2 koje se mogu upotrijebiti kao kontrola kvalitete za staničnu liniju hER α -HeLa-9 903, jažice s kontrolom nosača tretirane DMSO-om (ili odgovarajućim otapalom), jažice s 0,1 % DMSO-a tretirane dodatkom DMSO-a i E2 koje odgovaraju kontroli s dodanom poznatom količinom tvari („spike-in” kontrola), jažice tretirane s konačnom koncentracijom 1 μ M OHT-a te jažice tretirane s 100 μ M digitonina (tablica 5.). Kod kasnijih testnih ploča treba se slijediti isti raspored na ploči bez jažica iz referentnih normi (tablica 6.). Ako se u istom pokusu upotrebljavaju stanice iz različitih izvora (npr. različiti broj pasaže, različita serija itd.), referentne norme trebaju se ispitati za svaki izvor stanica.

Tablica 6

Primjer rasporeda koncentracija na pločama za ispitivane kemikalije i kemikalije za kontrolu na testnoj ploči za antagonist estrogenskog receptora

Reda k	Ispitivana kemikalija 1			Ispitivana kemikalija 2			Ispitivana kemikalija 3			Ispitivana kemikalija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	konc. 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO-a	→	→	→	→	→	1 μ M OHT-a	→	→	100 μ M digitonina (Dig)	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola s nosačem (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2); OHT: 4-hidroksitamoksifen, Dig: digitonin.

 : dodano 25 pM E2

29. Prema potrebi treba potvrditi izostanak rubnih učinaka, a ako se sumnja na rubne učinke, treba promijeniti raspored na ploči kako bi se izbjegli ti učinci. Na primjer, može se upotrijebiti raspored na ploči koji isključuje rubne jažice.
30. Nakon dodavanja kemikalija testne ploče treba inkubirati u inkubatoru s 5 % CO₂ na 37 $\pm$ 1 °C od 20 do 24 sata kako bi se inducirali proizvodi reporterskog gena.
31. Posebnu pozornost treba posvetiti spojevima koji su jako hlapljivi. U tim slučajevima kontrolne jažice koje se nalaze u blizini mogu dati lažno pozitivne rezultate i to treba uzeti u obzir u kontekstu očekivanih i prijašnjih vrijednosti kontrola. U nekim slučajevima u kojima hlapljivost može biti problem mogu se upotrijebiti poklopci za ploče kako bi se tijekom ispitivanja učinkovito izolirale pojedinačne jažice pa se stoga u tim slučajevima preporučuje njihova upotreba.
32. Ponavljanja konačnih ispitivanja za istu kemikaliju treba provoditi na različite dane kako bi se osigurala neovisnost.

Test luciferaze

33. Za test se može upotrijebiti komercijalni reagens za test luciferaze [npr. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 ili ekvivalentno)] ili standardni sustav testa luciferaze (npr. Promega, E1500 ili ekvivalentno) pod uvjetom da su ispunjeni kriteriji prihvatljivosti. Reagens za test treba odabrati na temelju osjetljivosti lumino-metra koji se koristi. Ako se koristi standardni sustav testa luciferaze, prije dodavanja supstrata treba upotrijebiti reagens za liziranje stanične kulture. Reagens za luciferazu treba primijeniti prema uputama proizvođača.

ANALIZA PODATAKA

Test agonista estrogenskog receptora

34. Kad je riječ o testu agonista estrogenskog receptora, da bi se dobila relativna transkripcijska aktivnost u odnosu na pozitivnu kontrolu (1 nM E2), signali luminiscencije s iste ploče mogu se analizirati prema sljedećim koracima (prihvatljivi su i drugi ekvivalentni matematički postupci):

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem.

Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.

Korak 3. Izračunati srednju vrijednost za normaliziranu pozitivnu kontrolu.

Korak 4. Podijeliti normaliziranu vrijednost svake jažice na ploči srednjom vrijednošću normalizirane pozitivne kontrole (PC = 100 %).

Konačna vrijednost svake jažice relativna je transkripcijska aktivnost za tu jažicu u usporedbi s odgovorom pozitivne kontrole.

Korak 5. Izračunati srednju vrijednost relativne transkripcijske aktivnosti za svaku koncentracijsku skupinu ispitivane kemikalije. Odgovor ima dvije dimenzije: prosječnu transkripcijsku aktivnost (odgovor) i koncentraciju pri kojoj dolazi do odgovora (vidjeti sljedeći odjeljak).

Razmatranja o indukciji vrijednosti EC₅₀, PC₅₀ i PC₁₀

35. Za izračun vrijednosti EC₅₀ potrebna je cijela krivulja koncentracija – odgovor, ali to se ne može uvijek postići ili nije praktično zbog ograničenja raspona ispitne koncentracije (na primjer, zbog citotoksičnosti ili poteškoća s topljivosti). Međutim, budući da su EC₅₀ i najveća razina indukcije (koja odgovara najvećoj vrijednosti Hillove jednadžbe) informativni parametri, treba ih navesti kada je to moguće. Za izračun vrijednosti EC₅₀ i najveće razine indukcije treba koristiti primjereni statistički softver (npr. statistički softver Graphpad Prism). Ako je na podatke o koncentraciji i odgovoru primjenjiva Hillova logistička jednadžba, vrijednost EC₅₀ treba izračunati prema sljedećoj jednadžbi (7.):

$$Y = \text{dno} + (\text{vrh} - \text{dno}) / (1 + 10^{\exp((\log EC_{50} - X) \times \text{Hillov nagib})}) \text{ pri čemu je:}$$

X logaritam koncentracije, a

Y odgovor te Y počinje na dnu i kreće se do vrha sigmoidne krivulje. Dno je u Hillovoj logističkoj jednadžbi utvrđeno na nulu.

36. Za svaku ispitivanu kemikaliju treba navesti sljedeće:

RPC_{Max} (maksimalna razina odgovora koju inducira ispitivana kemikalija, izražena kao postotak odgovora koji inducira 1 nM E2 na istoj ploči) te PC_{Max} (koncentracija povezana s vrijednosti RPC_{Max}) i,

u slučaju pozitivnih kemikalija, koncentracije koje induciraju PC₁₀ i, ako je primjereno, PC₅₀.

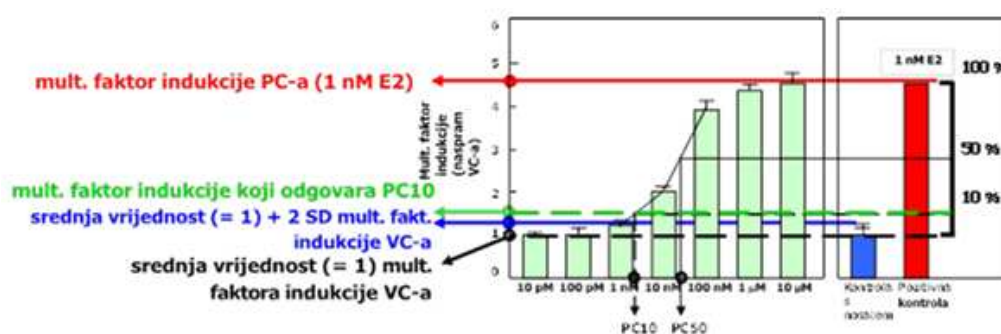
37. Vrijednost PCx može se izračunati interpolacijom između dvije točke na koordinatama X-Y, jedne neposredno iznad i jedne neposredno ispod vrijednosti PCx. Ako podatkovne točke koje se nalaze neposredno iznad i ispod vrijednosti PCx imaju koordinate (a,b) i (c,d), vrijednost PCx može se izračunati prema sljedećoj jednadžbi:

$$\log[PCx] = \log[c] + (x - d) / (d - b)$$

38. Opisi vrijednosti PC navedeni su na slici 1. u nastavku.

Slika 1

Primjer načina na koji se izvođe vrijednosti pozitivne kontrole. PC (1 nM E2) stavlja se na svaku testnu ploču



Test antagonista estrogenskog receptora

39. Kad je riječ o testu antagonista estrogenskog receptora, da bi se dobila relativna transkripcijska aktivnost u odnosu na kontrolu s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*) (25 nM E2), signali luminiscencije s iste ploče mogu se analizirati prema sljedećim koracima (prihvatljivi su i drugi ekvivalentni matematički postupci).

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem.

Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.

Korak 3. Izračunati srednju vrijednost za normaliziranu kontrolu s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*).

Korak 4. Podijeliti normaliziranu vrijednost svake jažice na ploči srednjom vrijednošću normalizirane kontrole s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in* kontrola = 100 %).

Konačna vrijednost svake jažice relativna je transkripcijska aktivnost za tu jažicu u usporedbi s odgovorom kontrole s dodanom poznatom količinom tvari.

Korak 5. Izračunati srednju vrijednost relativne transkripcijske aktivnosti za svako tretiranje.

Razmatranja o indukciji vrijednosti IC₃₀ i IC₅₀

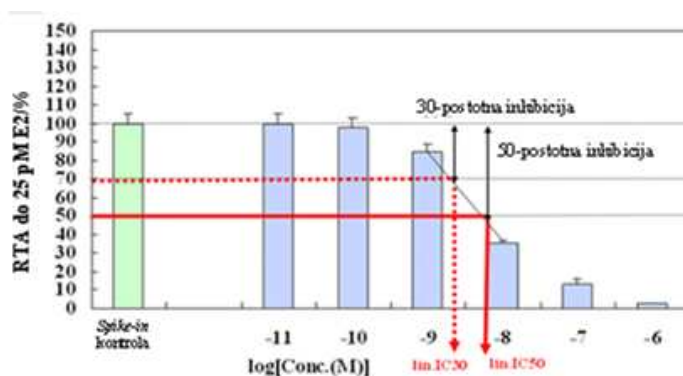
40. U slučaju pozitivnih kemikalija treba navesti koncentracije koje induciraju IC₃₀ i, ako je primjereno, IC₅₀.

41. Vrijednost IC_x može se izračunati interpolacijom između dvije točke na koordinatama X-Y, jedne neposredno iznad i jedne neposredno ispod vrijednosti IC_x. Ako podatkovne točke koje se nalaze neposredno iznad i ispod vrijednosti IC_x imaju koordinate (c,d) i (a,b), vrijednost IC_x može se izračunati prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{lin IC}_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

Slika 2

Primjer načina na koji se izводе vrijednosti IC. Kontrola s dodanom poznatom količinom tvari (spike-in) (25 pM E2) stavlja se na svaku testnu ploču



RTA: relativna transkripcijska aktivnost

42. Rezultati se trebaju temeljiti na dva (ili tri) neovisna ciklusa. Ako se u dva ciklusa dobiju usporedivi, a time i ponovljivi rezultati, ne mora se provoditi treći ciklus. Da bi bili prihvatljivi, rezultati trebaju:

— ispunjavati kriterije prihvatljivosti (vidjeti stavke od 14. do 20. o kriterijima prihvatljivosti),

— biti ponovljivi.

Kriteriji za tumačenje podataka

Tablica 7.

Kriteriji za donošenje pozitivne i negativne odluke u testu agonista estrogenskog receptora

Pozitivna	Ako se dobije vrijednost RPC_{Max} koja je jednaka ili veća od 10 % odgovora pozitivne kontrole u najmanje dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.
Negativna	Ako se ne uspije dobiti vrijednost RPC_{Max} koja iznosi barem 10 % odgovora pozitivne kontrole u dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.

Tablica 8.

Kriteriji za donošenje pozitivne i negativne odluke u testu antagonista estrogenskog receptora

Pozitivna	Ako se IC_{30} izračuna u najmanje dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.
Negativna	Ako se IC_{30} ne uspije izračunati u dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.

43. Kriteriji za tumačenje podataka navedeni su u tablicama 7. i 8. Pozitivne rezultate karakterizirat će i razmjer učinka i koncentracija pri kojoj dolazi do učinka. Oba ta cilja ostvaruju se izražavanjem rezultata kao koncentracije pri kojoj se postiže 50 % (PC_{50}) ili 10 % (PC_{10}) vrijednosti PC za test agonista te se inhibira 50 % (IC_{50}) ili 30 % (IC_{30}) vrijednosti kontrole s dodanom poznatom količinom tvari (*spike-in*) za test antagonista. Međutim, ispitivana kemikalija određuje se kao pozitivna ako je najveći odgovor koji ona inducira (RPC_{Max}) jednak ili veći od 10 % odgovora pozitivne kontrole u najmanje dva od dva provedena ciklusa ili dva od tri provedena ciklusa, dok se ispitivana kemikalija smatra negativnom ako RPC_{Max} ne uspije ostvariti 10 % odgovora pozitivne kontrole u dva od dva provedena ciklusa ili u dva od tri provedena ciklusa.
44. Vrijednosti PC_{10} , PC_{50} i PC_{Max} u testu agonista estrogenskog receptora te IC_{30} i IC_{50} u testu antagonista estrogenskog receptora mogu se izračunati s pomoću proračunske tablice koja je dostupna sa Smjernicom za ispitivanje na javnom web-mjestu OECD-a ⁽²⁾.
45. Trebalo bi biti dovoljno dobiti vrijednosti PC_{10} ili PC_{50} i IC_{30} ili IC_{50} najmanje dva puta. Međutim, ako osnovica za podatke u istom rasponu koncentracije koja iz toga proizade pokazuje varijabilnost s neprihvatljivo visokim koeficijentom varijacije (CV; %), podaci se ne mogu smatrati pouzdanima i treba utvrditi izvor velike varijabilnosti. Koeficijent varijacije neobrađenih podataka iz tri ponavljanja (tj. podaci o intenzitetu fluorescencije) podatkovnih točaka koje se upotrebljavaju za izračun vrijednosti PC_{10} treba biti manji od 20 %.
46. Ispunjavanje kriterija prihvatljivosti znači da sustav testa pravilno funkcionira, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni ciklus dati točne rezultate. Ponavljanje rezultata prvog ciklusa najbolje je jamstvo toga da su dobiveni točni podaci.
47. U slučaju testa agonista estrogenskog receptora, ako je za ispitivanje za pozitivne ispitivane kemikalije, osobito za kemikalije PC10-PC49 te kemikalije za koje se sumnja da pretjerano stimuliraju luciferazu, potrebno više informacija u svrhu probira i utvrđivanja prioriteta ove smjernice za ispitivanje, upotrebom antagonista ERa može se potvrditi da je uočena aktivnost luciferaze isključivo odgovor specifičan za ERa (vidjeti Dodatak 2.1.).

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

48. Vidjeti stavak 20. odjeljka „SASTAVNICE ER TA TESTA“.

LITERATURA

1. OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1 459.–1 469.
3. Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.*, 139, 4 252.–4 263.

⁽²⁾ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

4. Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, 78(1), 89.–94.
5. Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769.–71.
6. Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 953.–9.
7. De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, *Am. J. Physiol.*, 235, E97.–E102.

Dodatak 2.1.

LAŽNO POZITIVNI REZULTATI: PROCJENA SIGNALA LUMINISCENCIJE KOJIMA NE POSREĐUJU RECEPTORI

1. Lažno pozitivne rezultate u testu agonista estrogenskog receptora može uzrokovati aktivacija gena luciferaze koja nije posredovana estrogenskim receptorom ili izravna aktivacija genskog produkta ili nepovezana fluorescencija. Na takve učinke upućuje nepotpuna ili neobična krivulja doza – odgovor. Ako se sumnja na takve učinke, treba ispitati učinak antagonista estrogenskog receptora (npr. 4-hidroksitamoksifena (OHT) pri koncentraciji koja nije toksična) na odgovor. U tu svrhu možda neće biti primjeren čisti antagonist ICI 1827 80 jer dovoljna koncentracija antagonista ICI 1827 80 može smanjiti vrijednost kontrole s nosačem, a to će utjecati na analizu podataka.
2. Kako bi se osigurala valjanost ovog pristupa, na istoj se ploči mora ispitati:
 - agonističko djelovanje nepoznate kemikalije sa/bez 10 μ M OHT-a,
 - kontrola s nosačem (tri ponavljanja),
 - OHT (tri ponavljanja),
 - 1 nM E2 (tri ponavljanja) kao agonistička pozitivna kontrola,
 - 1 nM E2 + OHT (tri ponavljanja).

Kriteriji za tumačenje podataka

Napomena: sve jažice treba tretirati istom koncentracijom nosača.

- Ako tretiranje antagonistom estrogenskog receptora NE utječe na agonističko djelovanje nepoznate kemikalije, ona se razvrstava kao „negativna”.
- Ako je agonističko djelovanje nepoznate kemikalije potpuno inhibirano, primjenjuju se kriteriji za donošenje odluke.
- Ako je agonističko djelovanje pri najmanjoj koncentraciji jednako ili veće od odgovora PC₁₀, nepoznata kemikalija inhibirana je jednako ili više od odgovora PC₁₀. Računa se razlika u odgovorima između jažica koje nisu tretirane i koje su tretirane agonistom estrogenskog receptora i tu razliku treba smatrati stvarnim odgovorom i koristiti za izračun odgovarajućih parametara kako bi se omogućilo donošenje odluke o razvrstavanju.

Analiza podataka

Provjeriti zahtjeve izvedbe.

Provjeriti koeficijent varijacije između jažica tretiranih u istim uvjetima.

1. Izračunati srednju vrijednost kontrole s nosačem.
2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake jažice koja nije tretirana OHT-om.
3. Izračunati srednju vrijednost OHT-a.
4. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem od vrijednosti svake jažice koja je tretirana OHT-om.
5. Izračunati srednju vrijednost pozitivne kontrole.
6. Izračunati relativnu transkripcijsku aktivnost svih ostalih jažica u odnosu na pozitivnu kontrolu.

Dodatak 2.2.

PRIPREMA SERUMA TRETIRANOG UGLJENOM PREMAZANIM DEKSTRANOM (DCC)

1. Tretiranje seruma ugljenom premazanim dekstranom (DCC) opća je metoda za uklanjanje estrogenih spojeva iz seruma koji se dodaje mediju za stanice kako bi se isključio pristrani odgovor povezan s preostalim estrogenom u serumu. Ovim se postupkom može tretirati 500 ml fetalnog govedeg seruma (FBS).

Sastavnice

2. Bit će potrebni sljedeći materijali i oprema:

Materijali

Aktivni ugljen

Dekstran

Magnezijev klorid heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Saharoza

1 M puferne otopine HEPES (pH 7,4)

Ultračista voda dobivena sustavom za filtriranje

Oprema

Staklena posuda obrađena u autoklavu (veličinu treba prilagoditi po potrebi) Opća laboratorijska centrifuga (u kojoj se temperatura može postaviti na 4 °C)

Postupak

3. Sljedeći postupak prilagođen je za upotrebu epruveta za centrifugiranje od 50 ml.

[Dan 1.] Pripremiti suspenziju ugljena premazanog dekstranom s 1 l ultračiste vode koja sadržava 1,5 mM MgCl_2 , 0,25 M saharoze, 2,5 g ugljena, 0,25 g dekstrana i 5 mM HEPES-a te miješati preko noći na 4 °C.

[Dan 2.] Uliti suspenziju u epruvete za centrifugiranje od 50 ml i centrifugirati deset minuta na 10 000 °/min i temperaturi od 4 °C. Ukloniti supernatant i pohraniti polovinu sedimenta ugljena na temperaturi od 4 °C za upotrebu na dan 3. Suspendirati drugu polovinu ugljena s FBS-om koji je postupno odmrznut kako bi se izbjeglo taloženje i inaktiviran toplinom 30 minuta na 56 °C, a zatim prenijeti u staklenu posudu obrađenu u autoklavu kao što je Erlenmeyerova tikvica. Ovu suspenziju lagano miješati preko noći na temperaturi od 4 °C.

[Dan 3.] Uliti suspenziju s FBS-om u epruvete za centrifugiranje i centrifugirati deset minuta na 10 000 °/min i temperaturi od 4 °C. Prikupiti FBS i prenijeti ga u novi sediment ugljena pripremljen i pohranjen na dan 2. Suspendirati sediment ugljena i preko noći lagano miješati tu suspenziju na 4 °C u staklenoj posudi obrađenoj u autoklavu.

[Dan 4.] Uliti suspenziju i centrifugirati je deset minuta na 10 000 °/min i temperaturi od 4 °C te sterilizirati supernatant filtriranjem kroz sterilni filter od 0,2 µm. Ovaj FBS tretiran DCC-om treba pohraniti na -20 °C i može se upotrijebiti u roku od godinu dana.

Dodatak 3.

TEST TRANSAKTIVACIJE ESTROGENSKOG RECEPTORA ZA OTKRIVANJE AGONISTA I ANTAGONISTA ESTROGENSKOG RECEPTORA PRIMJENOM STANIČNE LINIJE VM7LUC

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

1. U ovom se testu upotrebljava stanična linija VM7Luc4E2 ⁽¹⁾. Validirali su ga NICEATM (Nacionalni toksikološki program Međuagencijskog centra za evaluaciju alternativnih toksikoloških metoda) i ICCVAM (Međuagencijski koordinacijski odbor za validaciju alternativnih metoda) (1.). Stanične linije VM7Luc uglavnom eksprimiraju endogeni ER α i manju količinu endogenog ER β (2., 3. i 4.).
2. Ovaj je test primjenjiv na velik raspon tvari pod uvjetom da se one mogu otopiti u dimetilsulfoksidu (DMSO; CAS br. 67-68-5), da ne reagiraju s DMSO-om ili medijem za uzgoj stanične kulture te da nisu citotoksične pri koncentracijama koje se ispituju. Ako nije moguće upotrijebiti DMSO, može se upotrijebiti drugi nosač kao što su etanol ili voda (vidjeti stavak 12.). Dokazana uspješnost testa (ant)agonista VM7Luc ER TA ukazuje na to da podaci koju se dobiju primjenom tog testa mogu dati informacije o mehanizmima djelovanja kojima posreduje estrogenski receptori te bi ga se moglo uzeti u obzir pri utvrđivanju prioriteta tvari za daljnje ispitivanje.
3. Ovaj je test posebno osmišljen za otkrivanje transaktivacije kojom posreduju hER α i hER β mjerenjem kemiluminiscencije kao krajnje točke. Kemiluminiscencija se često upotrebljava u biotestovima jer daje dovoljno snažan signal u odnosu na pozadinu. Međutim, aktivnost luciferaze krijesnica u testovima na staničnoj osnovi mogu poremetiti tvari koje inhibiraju enzim luciferaze, što uzrokuje i prividnu inhibiciju ili povećanu luminiscenciju zbog stabilizacije proteina. Osim toga, kod nekih luciferaznih testova reporterskog gena estrogenskog receptora pri koncentracijama fitoestrogena većima od 1 μ M zabilježeni su signali luminiscencije kojima ne posreduju receptori zbog pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu (9) (11). Iako krivulja doza – odgovor pokazuje da do stvarne aktivacije sustava estrogenskog receptora dolazi pri manjim koncentracijama, ekspresiju luciferaze dobivenu pri visokim koncentracijama fitoestrogena ili sličnih spojeva za koje se pretpostavlja da poput fitoestrogena dovode do pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu treba pažljivo ispitati sustavima ER TA testova sa stabilnom transfekcijom.
4. Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „OPĆI UVOD” i „SASTAVNICE ER TA TESTA”. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi opisuju se u Dodatku 1.

NAČELO TESTA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

5. Test se upotrebljava kako bi se označilo vezivanje estrogenskog receptora i liganda, nakon čega kompleks receptora i liganda translocira u jezgru. U jezgri se kompleks receptora i liganda veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen (luc), što dovodi do nastanka luciferaze i kasnije emisije svjetla, koja se može kvantificirati s pomoću luminometra. Aktivnost luciferaze može se procijeniti brzo i jeftino primjenom nekoliko komercijalno dostupnih pribora za ispitivanje. U testu VM7Luc ER TA upotrebljava se stanična linija humanog adenokarcinoma dojke koja reagira na estrogenski receptor, VM7, koja je stabilno transficirana konstruktom reporterskog gena luc krijesnice koji kontroliraju četiri elementa odgovora estrogena postavljena uzlazno od promotora virusa mišjeg

⁽¹⁾ Prije lipnja 2016. ta je stanična linija bila određena kao stanična linija BG1Luc. Stanice BG-1 izvorno su opisali Geisinger i dr. (1998.) (12.), a kasnije su ih okarakterizirali istraživači iz NIEHS-a (National Institute of Environmental Health Sciences) (13.). Relativno nedavno otkriveno je da postoje dvije različite varijante stanica BG-1 kojima se istraživači koriste – BG-1 Fr i BG-1 NIEHS. Temeljita analiza, uključujući DNK ispitivanje, tih dviju varijanti staničnih linija BG-1 koju su proveli Li i suradnici (2014.) (14.) pokazala je da je BG-1 Fr jedinstven i da BG-1 NIEHS, tj. izvorna stanična linija koja se koristila za razvoj testa, nije stanična linija humanog karcinoma jajnika BG1, već varijanta stanične linije humanog karcinoma dojke MCF7. Stanična linija upotrijebljena u ovom testu, koja se izvorno nazivala BG1Luc4E2 (15.), sada se određuje kao VM7Luc4E2 („V” = varijanta; „M7” = stanice MCF7). Isto tako, test se sada određuje kao VM7Luc ER TA. Iako se time mijenja podrijetlo stanične linije na kojoj se test temelji, ne utječe se na objavljene validacijske studije niti na korisnost i primjenu ovog testa za probir estrogenskih/antiestrogenskih kemikalija.

tumora dojke (MMTV) kako bi se otkrile tvari s *in vitro* agonističkim ili antagonističkim djelovanjem na estrogenski receptor. Taj promotor MMTV-a pokazuje samo manju unakrsnu reaktivnost s ostalim steroidnim i nesteroidnim hormonima (8.). Kriteriji za tumačenje podataka podrobno su opisani u stavku 41. Ukratko, pozitivni odgovor utvrđuje se na temelju krivulje koncentracija – odgovor, koja sadržava najmanje tri točke sa stupcima pogreške koje se ne preklapaju (srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija) te promjene amplitude (normalizirana relativna jedinica svjetlosti (RLU)) od najmanje 20 % najveće vrijednosti za referentnu normu (17 β -estradiol [E2; CAS br. 50-28-2] za test agonista, raloksifen HCl [Ral; CAS br. 84449-90-1]/E2 za test antagonista).

POSTUPAK

Stanična linija

6. Za test bi se trebala upotrebljavati stabilno transficirana stanična linija VM7Luc4E2. Stanična linija trenutačno je dostupna samo sklapanjem tehničkog sporazuma o licenciranju s ustanovom University of California, Davis, Kalifornija, SAD ⁽²⁾ i društvom Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, Sjeverna Karolina, SAD ⁽³⁾.

Stabilnost stanične linije

7. Kako bi se održali stabilnost i integritet stanične linije, stanice treba uzgajati za više od jedne pasaže od zamrznute matične zalihe u mediju za održavanje stanica (vidjeti stavak 9.). Stanice se ne bi trebale uzgajati za više od 30 pasaža. Za staničnu liniju VM7Luc4E2 30 pasaža trajat će približno tri mjeseca.

Stanična kultura i uvjeti nasađivanja

8. Treba poštovati postupke utvrđene u Smjernicama za dobru praksu za stanične kulture (5. i 6.) kako bi se osigurala kvaliteta svih materijala i metoda te tako održali integritet, valjanost i obnovljivost svih provedenih aktivnosti.
9. Stanice VM7Luc4E2 održavaju se u mediju RPMI 1640 obogaćenom s 0,9 % mješavine penicilina i streptomicina i 8,0 % fetalnog goveđeg seruma (FBS) u namjenskom inkubatoru kulture tkiva na 37 °C $\pm$ 1 °C, vlažnosti od 90 % $\pm$ 5 % i s 5,0 % $\pm$ 1 % CO₂ u zraku.
10. Kada se dosegne konfluencija od ~ 80 %, uzgaja se supkultura stanica VM7Luc4E2 koje se kondicioniraju na okolinu bez estrogena 48 sati prije nasađivanja na ploče s 96 jažica radi izlaganja ispitivanim kemikalijama i analize indukcije aktivnosti luciferaze koja ovisi o estrogenu. Medij bez estrogena (EFM) sadržava Dulbeccov modificirani Eagleov medij (DMEM) obogaćen s 4,5 % FBS-a tretiranog ugljenom premazanom dekstranom, 1,9 % L-glutamina i 0,9 % mješavine penicilina i streptomicina. U plastičnoj opremi ne smije biti estrogene aktivnosti [vidjeti detaljni protokol (7.)].

Kriteriji prihvatljivosti

11. Prihvaćenje ili odbijanje ispitivanja temelji se na procjeni rezultata referentne norme i kontrole iz svakog pokusa provedenog na pločici s 96 jažica. Svaka referentna norma ispituje se s više koncentracija i koristi se više uzoraka svake referentne i kontrolne koncentracije. Rezultati se uspoređuju s kontrolama kvalitete (KK) u pogledu tih

⁽²⁾ Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, e-pošta: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649.

⁽³⁾ Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 SAD, e-pošta: info@dioxins.com, telefon: 919-688-4804, faks: 919-688-4404.

parametara koji su izvedeni iz baza prijašnjih podataka o agonistima i antagonistima koje je izradio svaki laboratorij tijekom dokazivanja osposobljenosti. Baze prijašnjih podataka kontinuirano se dopunjuju vrijednostima referentnih normi i kontrola. Promjene u opremi ili laboratorijskim uvjetima možda će zahtijevati ažuriranje baza prijašnjih podataka.

Test agonista

Ispitivanje za utvrđivanje raspona

- Indukcija: indukciju na ploči treba mjeriti tako da se prosječna vrijednost relativne jedinice svjetlosti (RLU) najveće referentne norme E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om. Obično se postiže peterostruka indukcija, ali u svrhu prihvatanja indukcija bi trebala biti četverostruka ili veća.
- Rezultati kontrola s DMSO-om: vrijednosti RLU kontrole s otapalom trebale bi biti do 2,5 puta standardne devijacije srednje vrijednosti RLU prijašnje kontrole s otapalom.
- Pokus koji ne ispuni bilo koji kriterij prihvatljivosti treba odbaciti i ponoviti.

Iscrpno ispitivanje

Obuhvaća kriterije prihvatljivosti iz ispitivanja za utvrđivanje raspona agonista i sljedeće:

- rezultate referentne norme: krivulja koncentracija – odgovor referentne norme E2 trebala bi imati sigmoidni oblik i barem tri vrijednosti koje se nalaze na linearnom dijelu krivulje koncentracija – odgovor,
- rezultate pozitivne kontrole: vrijednosti RLU kontrole s metoksiklorom trebale bi biti veće od srednje vrijednosti DMSO-a uvećane za tri standardne devijacije srednje vrijednosti DMSO-a,
- pokus koji ne ispuni bilo koji kriterij prihvatljivosti treba odbaciti i ponoviti.

Test antagonista

Ispitivanje za utvrđivanje raspona

- Smanjenje: smanjenje na ploči mjeri se tako da se prosječna vrijednost relativne jedinice svjetlosti (RLU) najveće referentne norme Ral/E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om. Obično se postiže peterostruko smanjenje, ali u svrhu prihvatanja smanjenje bi trebalo biti trostruko ili veće.
- Rezultati kontrole s E2: vrijednosti RLU kontrole s E2 trebale bi biti do 2,5 puta standardne devijacije srednje vrijednosti RLU prijašnje kontrole s E2.
- Rezultati kontrola s DMSO-om: vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om trebale bi biti do 2,5 puta standardne devijacije srednje vrijednosti RLU prijašnje kontrole s otapalom.

- Pokus koji ne ispuni bilo koji kriterij prihvatljivosti odbacuje se i ponavlja.

Iscrpno ispitivanje

Obuhvaća kriterije prihvatljivosti iz ispitivanja za utvrđivanje raspona antagonista i sljedeće:

- rezultate referentne norme: krivulja koncentracija – odgovor referentne norme Ral/E2 trebala bi imati sigmoidni oblik i barem tri vrijednosti koje se nalaze na linearnom dijelu krivulje koncentracija – odgovor,
- rezultate pozitivne kontrole: vrijednosti RLU kontrole s tamoksifenom/E2 trebale bi biti manje od srednje vrijednosti kontrole s E2 umanjene za tri standardne devijacije srednje vrijednosti kontrole s E2,
- pokus koji ne ispuni bilo koji kriterij prihvatljivosti odbacuje se i ponavlja.

Referentne norme, pozitivne kontrole i kontrole s nosačem

Kontrola s nosačem (testovi agonista i antagonista)

12. Nosač koji se upotrebljava za otapanje ispitivanih kemikalija treba ispitati kao kontrolu s nosačem. Nosač koji se koristio tijekom validacije testa VM7Luc ER TA bio je 1-postotni (v/v) dimetilsulfoksid (DMSO, CAS br. 67-68-5) (vidjeti stavak 24.). Ako se upotrebljava nosač koji nije DMSO, sve referentne norme, kontrole i ispitivane kemikalije treba prema potrebi ispitati u istom nosaču.

Referentna norma (utvrđivanje raspona agonista)

13. Referentnu normu čini E2 (CAS br. 50-28-2). Za ispitivanje za utvrđivanje raspona referentna norma sastoji se od serijskog razrjeđivanja četiriju koncentracija E2 ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ i $2,87 \times 10^{-12}$ M), pri čemu se svaka koncentracija ispituje u dvostrukim jažicama.

Referentna norma (iscrpno ispitivanje agonista)

14. E2 za iscrpno ispitivanje sastoji se od serijskog razrjeđivanja u omjeru 1: 2 koje se sastoji od 11 koncentracija (u rasponu od $3,67 \times 10^{-10}$ do $3,59 \times 10^{-13}$ M) E2 u dvostrukim jažicama.

Referentna norma (utvrđivanje raspona antagonista)

15. Referentna norma kombinacija je tvari Ral (CAS br. 84449-90-1) i E2 (CAS br. 50-28-2). Ral/E2 za ispitivanje za utvrđivanje raspona sastoji se od serijskog razrjeđivanja triju koncentracija tvari Ral ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$ i $1,92 \times 10^{-10}$ M) i fiksne koncentracije ($9,18 \times 10^{-11}$ M) E2 u dvostrukim jažicama.

Referentna norma (iscrpno ispitivanje antagonista)

16. Ral/E2 za iscrpno ispitivanje sastoji se od serijskog razrjeđivanja tvari Ral u omjeru 1: 2 (u rasponu od $2,45 \times 10^{-8}$ do $9,57 \times 10^{-11}$ M) i fiksne koncentracije ($9,18 \times 10^{-11}$ M) E2, a obuhvaća devet koncentracija tvari Ral/E2 u dvostrukim jažicama.

Slaba pozitivna kontrola (agonist)

17. Slabu pozitivnu kontrolu čini $9,06 \times 10^{-6}$ M p,p'-metoksiklora (metoksiklor; CAS br. 72-43-5) u EFM-u.

Slaba pozitivna kontrola (antagonist)

18. Slaba pozitivna kontrola sastoji se od tamoksifena (CAS br. 10540-29-1) $3,36 \times 10^{-6}$ M s $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 u EFM-u.

Kontrola s E2 (samo za test antagonista)

19. Kontrolu s E2 čini $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 u EFM-u i koristi se kao osnovna negativna kontrola.

Multiplikacijski faktor indukcije (agonist)

20. Indukcija aktivnosti luciferaze referentne norme (E2) mjeri se tako da se prosječna vrijednost RLU najveće referentne norme E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om i rezultat bi trebao biti veći od četverostruke vrijednosti.

Multiplikacijski faktor smanjenja (antagonist)

21. Srednja aktivnost luciferaze za referentnu normu (Ral/E2) mjeri se tako da se prosječna vrijednost RLU najveće referentne norme Ral/E2 podijeli prosječnom vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om i trebala bi biti veća od trostruke vrijednosti.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija (vidjeti stavak 14. i tablice 3. i 4. u odjeljku „SASTAVNICE ER TA TESTA” ove ispitne metode)

Nosač

22. Ispitivane kemikalije treba otopiti u otapalu koje otapa tu ispitivanu kemikaliju te se može miješati s medijem za stanice. Primjereni su nosači voda, etanol (čistoće od 95 % do 100 %) i DMSO. Ako se upotrebljava DMSO, ne bi se trebalo koristiti više od 1 % (v/v). Za sve bi nosače trebalo dokazati da najveći volumen koji se upotrebljava nije citotoksičan i da ne utječe na uspješnost testa. Referentne norme i kontrole otapaju se u 100-postotnom otapalu i zatim se razrjeđuju na odgovarajuće koncentracije u EFM-u.

Priprema ispitivanih kemikalija

23. Ispitivane kemikalije otapaju se u 100-postotnom DMSO-u (ili odgovarajućem otapalu) i zatim se razrjeđuju na odgovarajuće koncentracije u EFM-u. Sve ispitivane kemikalije trebalo bi ostaviti tako da se njihova temperatura izjednači sa sobnom temperaturom prije nego što ih se otopi i razrijedi. Za svaki pokus treba pripremiti svježe otopine ispitivane kemikalije. U otopinama ne smije biti primjetan talog ili zamućenje. Uzorci referentne norme i kontrole mogu se pripremati zbirno; međutim, za svaki pokus treba pripremiti svježu konačnu referentnu normu, razrjeđivanja kontrole i ispitivane kemikalije i treba ih upotrijebiti u roku od 24 sata od pripreme.

Topljivost i citotoksičnost: razmatranja o utvrđivanju raspona

24. Ispitivanje za utvrđivanje raspona sastoji se od serijskih razrjeđivanja u sedam točaka u omjeru 1: 10 i provodi se dvaput. Ispitivane kemikalije prvo se ispituju do najveće koncentracije od 1 mg/ml (~ 1 mM) za test agonista i 20 µg/ml (~ 10 µM) za test antagonista. Pokusi za utvrđivanje raspona provode se kako bi se utvrdilo sljedeće:

- početne koncentracije ispitivane kemikalije koje će se upotrebljavati tijekom iscrpnog ispitivanja,
- razrjeđivanja ispitivane kemikalije (1: 2 ili 1: 5) koja će se upotrebljavati tijekom iscrpnog ispitivanja.

25. U protokole za test agonista i antagonista uključena je procjena vijabilnosti stanica/citotoksičnosti (7.) te se ona uključuje u test za utvrđivanje raspona i iscrpno ispitivanje. Metoda citotoksičnosti upotrijebljena za procjenu vijabilnosti stanica tijekom validacije testa VM7Luc ER TA (1.) bila je metoda razmjernog kvalitativnog vizualnog opažanja; međutim, za utvrđivanje citotoksičnosti može se upotrijebiti kvantitativna metoda (vidjeti protokol (7.)). Ne mogu se upotrebljavati podaci iz koncentracija ispitivane kemikalije koje uzrokuju smanjenje vijabilnosti veće od 20 %.

Izlaganje ispitivanoj kemikaliji i organizacija testne ploče

26. Stanice se broje i nasaduju na ploče s kulturom tkiva s 96 jažica (2×10^5 stanica po jažici) u EFM-u i inkubiraju se 24 sata kako bi se omogućilo da se stanice pričvrste na ploču. EFM se uklanja i zamjenjuje ispitivanim i referentnim kemikalijama u EFM-u te se inkubira 19–24 sata. Posebnu pozornost treba posvetiti tvarima koje su jako hlapljive jer kontrolne jažice koje se nalaze u blizini mogu dati lažno pozitivne rezultate. U tim slučajevima mogu pomoći „poklopci za ploče” kojima se učinkovito izoliraju pojedinačne jažice pa se stoga preporučuje njihova upotreba.

Ispitivanja za utvrđivanje raspona

27. U ispitivanjima za utvrđivanje raspona upotrebljavaju se sve jažice ploče s 96 jažica kako bi se dvaput ispitalo do šest ispitivanih kemikalija kao serijska razrjeđivanja u sedam točaka u omjeru 1: 10 (vidjeti slike 1. i 2.).

— U ispitivanju za utvrđivanje raspona agonista upotrebljavaju se četiri koncentracije E2 u dva ponavljanja kao referentna norma i četiri jažice s ponavljanjem za kontrolu s DMSO-om.

— U ispitivanju za utvrđivanje raspona antagonista upotrebljavaju se tri koncentracije tvari Ral/E2 s $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 u dva ponavljanja kao referentna norma i tri jažice s ponavljanjem za kontrole s E2 i DMSO-om.

Slika 1.

Raspored na ploči s 96 jažica kod ispitivanja za utvrđivanje raspona agonista

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Kratice: E2-1 do E2-4 = koncentracije referentne norme E2 (od visoke do niske); TC1-1 do TC1-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 1 (TC1); TC2-1 do TC2-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 2 (TC2); TC3-1 do TC3-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 3 (TC3); TC4-1 do TC4-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 4 (TC4); TC5-1 do TC5-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 5 (TC5); TC6-1 do TC6-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 6 (TC6); VC = kontrola s nosačem (DMSO (1 % v/v EFM-a)).

Slika 2.

Raspored na ploči s 96 jažica kod ispitivanja za utvrđivanje raspona antagonista

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Kratice: E2 = kontrola s E2; Ral-1 do Ral-3 = koncentracije raloksifena/referentne norme E2 (od visoke do niske); TC1-1 do TC1-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 1 (TC1); TC2-1 do TC2-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 2 (TC2); TC3-1 do TC3-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 3 (TC3); TC4-1 do TC4-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 4 (TC4); TC5-1 do TC5-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 5 (TC5); TC6-1 do TC6-7 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 6 (TC6); VC = kontrola s nosačem (DMSO [1 % v/v EFM-a]).

Napomena: Sve ispitivane kemikalije ispituju se s $9,18 \times 10^{-11}$ M E2.28.

Preporučeni konačni volumen medija potrebnog za svaku jažicu iznosi 200 µl. Trebaju se upotrebljavati samo ispitne ploče kod kojih vijabilnost stanica u svim jažicama iznosi 80 % ili više.

29. Utvrđivanje početne koncentracije za iscrpno ispitivanje **agonista** posebno je opisano u protokolu za agoniste (7.). Ukratko, primjenjuju se sljedeći kriteriji:

- ako na krivulji koncentracije ispitivane kemikalije nema točaka koje su veće od srednje vrijednosti uvećane za tri standardne devijacije kontrole s DMSO-om, iscrpno ispitivanje provest će se upotrebom serijskog razrjeđivanja u 11 točaka u omjeru 1: 2, počevši od najviše topljive koncentracije,
- ako na krivulji koncentracije ispitivane kemikalije postoje točke koje su veće od srednje vrijednosti uvećane za tri standardne devijacije kontrole s DMSO-om, početna koncentracija koja se u iscrpnom ispitivanju upotrebljava za plan razrjeđivanja od 11 točaka treba biti jedan log viša od koncentracije koja je dala najvišu prilagođenu vrijednost RLU u ispitivanju za utvrđivanje raspona. Plan razrjeđivanja od 11 točaka temeljit će se na omjeru 1: 2 ili 1: 5 u skladu sa sljedećim kriterijima:

serijsko razrjeđivanje od 11 točaka u omjeru 1: 2 treba upotrijebiti ako će nastali raspon koncentracija obuhvaćati cijeli raspon odgovora na temelju krivulje koncentracija – odgovor koja je nastala u ispitivanju za utvrđivanje raspona. U suprotnom treba upotrijebiti razrjeđivanje u omjeru 1: 5,

- ako ispitivana kemikalija u ispitivanju za utvrđivanje raspona pokaže dvofazičnu krivulju koncentracija – odgovor, obje faze treba utvrditi i u iscrpnom ispitivanju.

30. Utvrđivanje početnih koncentracija za iscrpno ispitivanje **antagonista** posebno je opisano u protokolu za antagoniste (7.). Ukratko, primjenjuju se sljedeći kriteriji:

- ako na krivulji koncentracije ispitivane kemikalije nema točaka koje su manje od srednje vrijednosti umanjene za tri standardne devijacije kontrole E2, iscrpno ispitivanje provest će se upotrebom serijskog razrjeđivanja u 11 točaka u omjeru 1: 2, počevši od najviše topljive koncentracije,

— ako na krivulji koncentracije ispitivane kemikalije postoje točke koje su manje od prosječne vrijednosti umanjene za tri standardne devijacije kontrole s E2, početna koncentracija koja se u iscrpnom ispitivanju upotrebljava za plan razrjeđivanja od 11 točaka treba biti jedna od sljedećih opcija:

- koncentracija koja daje najmanju prilagođenu vrijednost RLU u testu za utvrđivanje raspona,
- najviša topljiva koncentracija (vidjeti protokol za antagoniste (7.), slika 14-2.),
- najniža citotoksična koncentracija (vidjeti protokol za antagoniste (7.), slika 14-3. za povezani primjer),

— plan razrjeđivanja od 11 točaka temeljit će se na serijskom razrjeđivanju u omjeru 1: 2 ili 1: 5 u skladu sa sljedećim kriterijima:

serijsko razrjeđivanje od 11 točaka u omjeru 1: 2 treba upotrijebiti ako će nastali raspon koncentracija obuhvaćati cijeli raspon odgovora na temelju krivulje koncentracija – odgovor koja je nastala u ispitivanju za utvrđivanje raspona. U suprotnom treba upotrijebiti razrjeđivanje u omjeru 1: 5.

Iscrpno ispitivanje

31. Iscrpno ispitivanje sastoji se od serijskih razrjeđivanja od 11 točaka (serijska razrjeđivanja u omjeru 1: 2 ili 1: 5 na temelju početne koncentracije za kriterije iscrpnih testova), pri čemu se svaka koncentracija ispituje u trostrukim jažicama ploče s 96 jažica (vidjeti [slike 3. i 4.](#)).

— U iscrpnom ispitivanju agonista kao referentna norma upotrebljava se 11 koncentracija E2 u dva ponavljanja. Svaka ploča uključuje četiri jažice s ponavljanjem za kontrolu s DMSO-om i četiri jažice s ponavljanjem za kontrolu s metoksiklorom ($9,06 \times 10^{-6}$ M).

— U iscrpnom ispitivanju antagonista kao referentna norma upotrebljava se devet koncentracija tvari Ral/E2 s $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 u dva ponavljanja, s četiri jažice s ponavljanjem za kontrolu $9,18 \times 10^{-11}$ M E2, četiri jažice s ponavljanjem za kontrolu s DMSO-om i četiri jažice s ponavljanjem za tamoksifen $3,36 \times 10^{-6}$ M.

Slika 3.

Raspored na ploči s 96 jažica kod iscrpnog ispitivanja agonista

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Kratice: TC1-1 do TC1-11 = koncentracije ispitivane kemikalije 1 (od visoke do niske); TC2-1 do TC2-11 = koncentracije ispitivane kemikalije 2 (od visoke do niske); E2-1 do E2-11 = koncentracije referentne norme E2 (od visoke do niske); Meth = slaba pozitivna kontrola p,p' metoksiklor; VC = kontrola s nosačem DMSO (1 % v/v) u EFM-u.

Slika 4.

Raspored na ploči s 96 jažica kod iscrpnog ispitivanja antagonista

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Kratice: E2 = kontrola s E2; Ral-1 do Ral-9 = koncentracije raloksifena/referentne norme E2 (od visoke do niske); Tam = slaba pozitivna kontrola s tamoksifenom/E2; TC1-1 do TC1-11 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 1 (TC1); TC2-1 do TC2-11 = koncentracije (od visoke do niske) ispitivane kemikalije 2 (TC2); VC = kontrola s nosačem (DMSO [1 % v/v EFM-a]).

Napomena: kako je navedeno, sve referentne i ispitivane jažice sadržavaju fiksnu koncentraciju E2 ($9,18 \times 10^{-11}$ M).

32. Ponavljanja iscrpnih ispitivanja za istu kemikaliju treba provoditi na različite dane kako bi se osigurala neovisnost. Treba provesti barem dva iscrpna ispitivanja. Ako su rezultati testova kontradiktorni (npr. jedan je test pozitivan, a drugi negativan) ili ako jedan od testova nije primjeren, treba provesti treći dodatni test.

Mjera luminiscencije

33. Luminiscencija se mjeri u rasponu od 300 do 650 nm, upotrebom ubrizgavajućeg luminometra sa softverom koji kontrolira volumen ubrizgavanja i interval mjerenja (7.). Emisija svjetlosti iz svake jažice izražava se kao RLU po jažici.

ANALIZA PODATAKA

Utvrđivanje vrijednosti EC_{50}/IC_{50}

34. Vrijednost EC_{50} (pola najveće učinkovite koncentracije ispitivane kemikalije [agonisti]) i vrijednost IC_{50} (pola najveće inhibitorne koncentracije ispitivane kemikalije [antagonisti]) utvrđuju se na temelju podataka o koncentraciji i odgovoru. Za ispitivane kemikalije koje su pozitivne pri jednoj koncentraciji ili njih više, koncentracija ispitivane kemikalije koja uzrokuje pola najvećeg odgovora (IC_{50} ili EC_{50}) računa se upotrebom analize Hillove funkcije ili primjerene alternative. Hillova funkcija logistički je matematički model s četiri parametra kojim se povezuju koncentracija ispitivane kemikalije i odgovor (obično u obliku sigmoidne krivulje) primjenom sljedeće jednadžbe:

$$Y = dno + \frac{(vrh - dno)}{1 + 10^{(\lg EC_{50} - X)Hillov\ nagib}}$$

pri čemu je:

X = logaritam koncentracije

Y = odgovor (tj. RLU-ovi)

dno = najmanji odgovor

vrh = najveći odgovor

$\lg EC_{50}$ (ili $\lg IC_{50}$) = logaritam od X kao odgovor koji se nalazi točno između vrha i dna

Hillov nagib = kosina krivulje.

Modelom se računa najbolja vrijednost za parametre vrha, dna, Hillova nagiba te vrijednosti IC_{50} i EC_{50} . Za izračun vrijednosti EC_{50} i IC_{50} treba upotrijebiti primjereni statistički softver (npr. statistički softver Graphpad PrismR).

Utvrđivanje netipičnih vrijednosti

35. Dobro statističko prosuđivanje moglo bi se olakšati uključivanjem (ali ne i isključivo) Q testa (vidjeti protokole za agoniste i antagoniste (7.)) o utvrđivanju „neupotrebljivih” jažica koje će se isključiti iz analiza podataka).
36. Za ponovljene uzorke referentne norme E2 (dva uzorka) bilo koja prilagođena vrijednost RLU za ponovljeni uzorak pri određenoj koncentraciji E2 smatra se netipičnom vrijednosti ako je za više od 20 % veća ili manja od prilagođene vrijednosti RLU te koncentracije iz baze prijašnjih podataka.

Prikupljanje i prilagodba podataka luminometra za ispitivanje za utvrđivanje raspona

37. Neobrađene podatke iz luminometra treba prenijeti u predložak proračunske tablice koja je izrađena za test. Treba utvrditi postoje li netipične podatkovne točke koje treba ukloniti. (Vidjeti kriterije prihvatljivosti ispitivanja za parametre koji se utvrđuju u analizama.) Trebalo bi provesti sljedeće izračune.

Agonist

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.

Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.

Korak 3. Izračunati srednji multiplikacijski faktor indukcije za referentnu normu (E2).

Korak 4. Izračunati srednju vrijednost EC_{50} za ispitivane kemikalije.

Antagonist

Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.

Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.

Korak 3. Izračunati srednji multiplikacijski faktor smanjenja za referentnu normu (Ral/E2).

Korak 4. Izračunati srednju vrijednost za referentnu normu E2.

Korak 5. Izračunati srednju vrijednost IC_{50} za ispitivane kemikalije.

Prikupljanje i prilagodba podataka luminometra za iscrpna ispitivanja

38. Neobrađene podatke iz luminometra treba prenijeti u predložak proračunske tablice koja je izrađena za test. Treba utvrditi postoje li netipične podatkovne točke koje treba ukloniti. (Vidjeti kriterije prihvatljivosti ispitivanja za parametre koji se utvrđuju u analizama.) Provede se sljedeći izračuni:

Agonist

- Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.
- Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.
- Korak 3. Izračunati srednji multiplikacijski faktor indukcije za referentnu normu (E2).
- Korak 4. Izračunati srednju vrijednost EC_{50} za E2 i ispitivane kemikalije.
- Korak 5. Izračunati srednju prilagođenu vrijednost RLU za metoksiklor.

Antagonist

- Korak 1. Izračunati srednju vrijednost za kontrolu s nosačem DMSO.
- Korak 2. Oduzeti srednju vrijednost kontrole s nosačem DMSO od vrijednosti svake jažice kako bi se podaci normalizirali.
- Korak 3. Izračunati srednji multiplikacijski faktor indukcije za referentnu normu (Ral/E2).
- Korak 4. Izračunati srednju vrijednost IC_{50} za Ral/E2 i ispitivane kemikalije.
- Korak 5. Izračunati srednju prilagođenu vrijednost RLU za tamoksifen.
- Korak 6. Izračunati srednju vrijednost za referentnu normu E2.

Kriteriji za tumačenje podataka

39. Test VM7Luc ER TA dio je pristupa snage dokaza kako bi se pomoglo utvrditi prioritetne tvari za *in vivo* ispitivanje endokrine disrupcije. Dio ovog postupka za utvrđivanje prioriteta bit će razvrstavanje ispitivane kemikalije kao pozitivne ili negativne u pogledu agonističkog ili antagonističkog djelovanja na estrogenski receptor. Kriteriji za donošenje pozitivne i negativne odluke koji su upotrijebljeni u validacijskoj studiji testa VM7Luc ER TA opisani su u tablici 1.

Tablica 1.

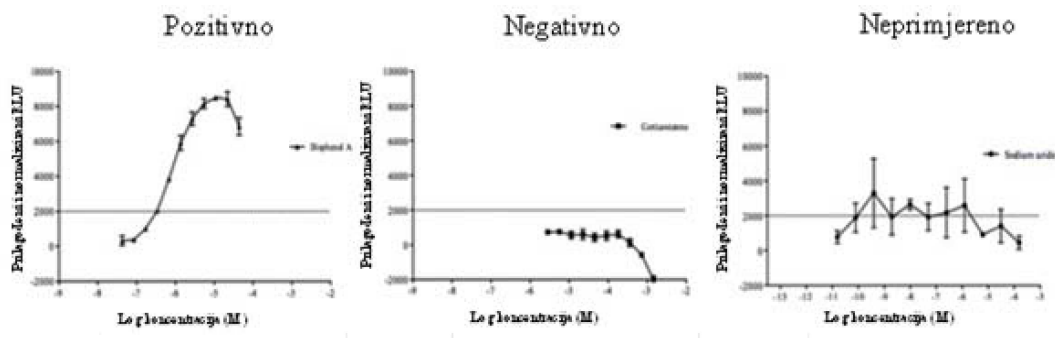
Kriteriji za donošenje pozitivne i negativne odluke

AGONISTIČKO DJELOVANJE	
Pozitivno	— Sve ispitivane kemikalije razvrstane kao <i>pozitivne na</i> agonističko djelovanje na estrogenski receptor trebaju imati krivulju koncentracija – odgovor koja se sastoji od osnovice, nakon koje dolazi pozitivan nagib i završava platoom ili najvišom točkom. U nekim se slučajevima mogu utvrditi samo dva svojstva (osnovica – nagib ili nagib – najviša točka). — Linija koja označava pozitivan nagib treba sadržavati najmanje tri točke sa stupcima pogreške koje se ne preklapaju (srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija). Isključene su točke koje čine osnovicu, ali linearni dio krivulje može uključivati najvišu točku ili prvu točku platoa. — Za razvrstavanje kemikalije kao pozitivne potrebna je amplituda odgovora (razlika između osnovice i najviše točke) od najmanje 20 % najveće vrijednosti za referentnu normu, E2 (tj. 2 000 RLU-ova ili više ako je najveća vrijednost odgovora referentnih normi [E2] prilagođena na 10 000 RLU-ova). — Ako je moguće, treba izračunati vrijednost EC_{50} za svaku pozitivnu ispitivanu kemikaliju.
Negativno	Prosječni prilagođeni RLU za određenu koncentraciju jednak je ili manji od srednje vrijednosti RLU kontrole s DMSO-om uvećane za tri standardne devijacije RLU-a DMSO-a.
Neprimjereno	Podaci koji se ne mogu tumačiti kao valjani za pokazivanje prisutnosti ili izostanka aktivnosti zbog velikih kvalitativnih ili kvantitativnih ograničenja smatraju se neprimjerenima i ne mogu se koristiti za utvrđivanje je li ispitivana kemikalija pozitivna ili negativna. Kemikalije treba ponovno ispitati.
ANTAGONISTIČKO DJELOVANJE	
Pozitivno	— Podaci o ispitivanoj kemikaliji daju krivulju koncentracija – odgovor koja se sastoji od osnovice, nakon koje dolazi negativan nagib. — Linija koja označava negativan nagib treba sadržavati najmanje tri točke sa stupcima pogreške koje se ne preklapaju; isključene su točke koje čine osnovicu, ali linearni dio krivulje može uključivati prvu točku platoa. — Trebalo bi postojati smanjenje aktivnosti od najmanje 20 % najveće vrijednosti za referentnu normu, tvar Ral/E2 (tj. 8 000 RLU-ova ili manje ako je najveća vrijednost odgovora referentne norme [Ral/E2] prilagođena na 10 000 RLU-ova). — Najviše koncentracije ispitivane kemikalije koje nisu citotoksične trebale bi biti 1×10^{-5} M ili niže. — Ako je moguće, treba izračunati vrijednost IC_{50} za svaku pozitivnu ispitivanu kemikaliju.
Negativno	Sve podatkovne točke iznad su vrijednosti EC_{80} (80 % odgovora E2 ili 8 000 RLU-ova), pri koncentracijama nižima od $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Neprimjereno	Podaci koji se ne mogu tumačiti kao valjani za pokazivanje prisutnosti ili izostanka aktivnosti zbog velikih kvalitativnih ili kvantitativnih ograničenja smatraju se neprimjerenima i ne mogu se koristiti za utvrđivanje je li ispitivana kemikalija pozitivna ili negativna. Kemikaliju treba ponovno ispitati.

40. Ako je moguće, pozitivne rezultate karakterizirat će i razmjer učinka i koncentracija pri kojoj dolazi do učinka. Primjeri pozitivnih, negativnih i neprimjerenih podataka prikazani su na slikama 5. i 6.

Slika 5.

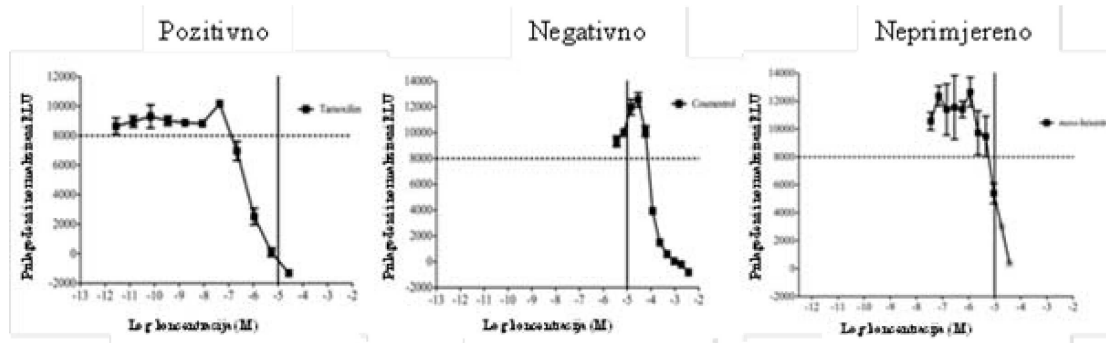
Primjeri agonista: pozitivni, negativni i neprimjereni podaci



Isprekidana linija pokazuje 20 % odgovora E2, 2 000 prilagođenih i normaliziranih RLU-ova.

Slika 6.

Primjeri antagonista: pozitivni, negativni i neprimjereni podaci



Isprekidana linija pokazuje 80 % odgovora Ral/E2, 8 000 prilagođenih i normaliziranih RLU-ova.

Puna linija pokazuje $1,00 \times 10^{-5}$ M. Da bi se odgovor smatrao pozitivnim, treba se nalaziti ispod linije 8 000 RLU-ova i pri koncentracijama nižima od $1,00 \times 10^{-5}$ M.

Koncentracije označene zvjezdicama na grafikonu mezo-heksestrola pokazuju rezultate vijabilnosti od „2” ili veće.

Rezultati ispitivanja za mezo-heksestrol smatraju se neprimjerenim podacima jer se do jedinog odgovora koji se nalazi ispod 8 000 RLU-ova dolazi pri $1,00 \times 10^{-5}$ M.

41. Vrijednosti EC_{50} i IC_{50} mogu se izračunati primjenom Hillove funkcije s četiri parametra (više pojedinosti potražiti u protokolima za agoniste i antagoniste (7.)). Ispunjavanje kriterija prihvatljivosti znači da sustav pravilno funkcionira, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni ciklus dati točne rezultate. Ponavljanje rezultata prvog ciklusa najbolje je jamstvo toga da su dobiveni točni podaci (vidjeti stavak 19. odjeljka „SASTAVNICE ER TA TESTA”).

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

42. Vidjeti stavak 20. odjeljka „SASTAVNICE ER TA TESTA”.

LITERATURA

1. ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
2. Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, *J. Cell Biochem.*, 82(3): 467.–479.
3. Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58(23): 5367.–5373.
4. Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β , a Modulator of ER α in the Uterus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 936.–5941.
5. Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), *ALTEX*, 23(Suppl): str. 270.–273.
6. Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33: str. 261.–287.
7. ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7850.
8. Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro Mol. Toxicol.*, 13(1):67.–82.
9. Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10):1459.–69.
10. Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology*, 17(6):646.–57.
11. Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinology*, 139(10):4252.–63.

12. Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280.–288.
13. Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649.–654.
14. Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072.–2081.
15. Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67.–82.

Dodatak 4.

TEST TRANSKATIVACIJE STABILNO TRANSFICIRANOG LJUDSKOG ESTROGENSKOG RECEPTORA-A ZA OTKRIVANJE ESTROGENSKOG AGONISTIČKOG I ANTAGONISTIČKOG DJELOVANJA KEMIKALIJA PRIMJENOM STANIČNE LINIJE ERa CALUX

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

1. U testu transaktivacije ERa CALUX upotrebljava se humana stanična linija U2OS radi otkrivanja estrogenskog agonističkog i antagonističkog djelovanja kojim posreduje ljudski estrogenski receptor alfa (hERa). Validacijska studija biotesta sa stabilno transficiranim stanicama ERa CALUX koju je proveo BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nizozemska) pokazala je relevantnost i pouzdanost testa za predviđenu svrhu (1.). Stanična linija ERa CALUX eksprimira samo stabilno transficirani humani ERa (2. i 3.).
2. Ovaj je test posebno osmišljen za otkrivanje transaktivacije kojom posreduje hERa mjerenjem bioluminiscencije kao krajnje točke. Bioluminiscencija se često upotrebljava u biotestovima zbog visokog omjera signala i šuma (4.).
3. Postoje izvješća o tome da koncentracije fitoestrogena veće od 1 µM pretjerano aktiviraju reporterski gen za luciferazu, što dovodi do luminiscencije kojom ne posreduju receptori (5., 6. i 7.). Stoga veće koncentracije fitoestrogena ili drugih sličnih spojeva koji mogu pretjerano aktivirati ekspresiju luciferaze treba pažljivo ispitati testovima transaktivacije stabilno transficiranog estrogenskog receptora (vidjeti Dodatak 2.).
4. Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „OPĆI UVOD” i „SASTAVNICE ER TA TESTA”. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi opisuju se u Dodatku 1.

NAČELO TESTA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

5. Biotest se upotrebljava kako bi se procijenilo vezivanje estrogenskog receptora i liganda te kasnija translokacija kompleksa receptora i liganda u jezgru. U jezgri se kompleks receptora i liganda veže na specifične elemente DNK odgovora i transaktivira reporterski gen za luciferazu klijesnice, što dovodi do povećane stanične ekspresije enzima luciferaze. Nakon dodavanja supstrata luciferaze luciferinu, luciferin se pretvara u bioluminescentan proizvod. Proizvedeno svjetlo može se jednostavno uočiti i kvantificirati s pomoću luminometra.
6. U ispitnom sustavu upotrebljavaju se stabilno transficirane stanice ERa CALUX. Stanice ERa CALUX potječu od stanične linije U2OS humanog osteoblastičnog osteosarkoma. Humane stanice U2OS stabilno su transficirane konstruktima 3xHRE-TATA-Luc i pSG5-neo-hERa upotrebom metode zajedničkog taloženja s kalcijevim fosfatom. Stanična linija U2OS odabrana je kao najbolji kandidat za reportersku staničnu liniju koja reagira na estrogen (i ostale steroidne hormone) na temelju opažanja da stanična linija U2OS pokazuje slabu endogenu aktivnost receptora ili je uopće ne pokazuje. Odsustvo endogenih receptora procijenjeno je upotrebom samo reporterskih plazmida za luciferazu, koji nisu pokazali nikakvu aktivnost kada su dodani ligandi na receptor. Nadalje, ta je stanična linija dala snažne odgovore posredovane hormonima kada su privremeno uvedeni srodni receptori (2., 3. i 8.).
7. Ispitivanje kemikalija radi utvrđivanja estrogene ili antiestrogene aktivnosti upotrebom stanične linije ERa CALUX uključuje ciklus predprobira i iscrpne cikluse. Tijekom ciklusa predprobira utvrđuju se topljivost, citotoksičnost i rafinirani raspon koncentracija ispitivanih kemikalija za iscrpno ispitivanje. Tijekom iscrpnih ciklusa rafinirani rasponi koncentracija ispitivanih kemikalija ispituju se biotestovima ERa CALUX, nakon čega slijedi razvrstavanje ispitivanih kemikalija u pogledu agonizma ili antagonizma.

8. Kriteriji za tumačenje podataka posebno su opisani u stavku 59. Ukratko, ispitivana kemikalija smatra se pozitivnom za agonizam ako barem dvije uzastopne koncentracije ispitivane kemikalije pokazuju odgovor koji iznosi 10 % najvećeg odgovora referentne norme 17 β -estradiol ili više (PC₁₀). Ispitivana kemikalija smatra se pozitivnom za antagonizam ako barem dvije uzastopne koncentracije ispitivane kemikalije pokazuju odgovor koji iznosi 80 % najvećeg odgovora referentne norme tamoksifena ili manje (PC₈₀).

POSTUPAK

Stanične linije

9. Za test bi se trebala upotrebljavati stabilno transficirana stanična linija U2OS ER α CALUX. Stanična linija može se dobiti od društva BioDetection Systems BV, Amsterdam, Nizozemska, sklapanjem tehničkog sporazuma o licenciranju.
10. Treba upotrebljavati samo stanične kulture u kojima nema mikoplazme. Šarže stanica koje se upotrebljavaju trebaju imati potvrdu da nisu kontaminirane mikoplazmom ili prije upotrebe treba provesti test na mikoplazmu. Za osjetljivo otkrivanje zaraze mikoplazmom treba upotrijebiti RT-PCR (lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu) (9.).

Stabilnost stanične linije

11. Kako bi se održali stabilnost i integritet stanica CALUX, stanice treba pohraniti u tekućem dušiku (–80 °C). Nakon odmrzavanja stanica kako bi se razvila nova kultura, stanice treba supkultivirati barem dva puta prije nego što ih se upotrijebi za procjenu estrogenskog agonističkog i antagonističkog djelovanja kemikalija. Stanice se ne bi se trebale supkultivirati za više od 30 pasaža.
12. Kako bi se pratila stabilnost stanične linije tijekom vremena, treba potvrditi osjetljivost ispitnog sustava za agonizam i antagonizam procjenom vrijednosti EC₅₀ ili IC₅₀ referentne norme. Osim toga, treba pratiti relativnu indukciju pozitivnog kontrolnog uzorka (PC) i negativnog kontrolnog uzorka (NC). Rezultati bi trebali biti u skladu s kriterijima prihvatljivosti za agonistički (tablica 3.C) ili antagonistički biotest ER α CALUX (tablica 4.C). Referentne norme, pozitivne i negativne kontrole navedene su u tablici 1. za agonistički oblik i tablici 2. za antagonistički oblik.

Stanična kultura i uvjeti nasadijanja

13. Stanice U2OS treba uzgajati u mediju za uzgoj (medij DMEM/F12 (1: 1) s fenol crvenom kao indikatorom pH-vrijednosti, obogaćenom fetalnim goveđim serumom (7,5 %), neesencijalnim aminokiselinama (1 %), s 10 jedinica/ml penicilina, streptomicina i geneticina (G-418) kao markerom za selekciju). Stanice treba staviti u inkubator CO₂ (5 % CO₂) na 37 °C uz 100-postotnu vlažnost. Kada stanice dosegnu konfluenciju od 85 do 95 %, treba ih supkultivirati ili pripremiti za nasadijanje na mikrotitracijske ploče s 96 jažica. U potonjem slučaju, stanice treba ponovno suspendirati u koncentraciji 1 $\times$ 10⁵ stanica/ml u mediju za test bez estrogena (DMEM/F12 (1: 1) bez fenol crvene, obogaćenom fetalnim goveđim serumom tretiranim ugljenom premazanom dekstranom (5 % v/v), neesencijalnim aminokiselinama (1 % v/v), s 10 jedinica/ml penicilina i streptomicina) te nasaditi u jažice mikrotitracijskih ploča s 96 jažica (100 μ l homogenizirane suspenzije stanica). Stanice treba predinkubirati u inkubatoru CO₂ (5 % CO₂, 37 °C, 100-postotna vlažnost) 24 sata prije izlaganja. U plastičnoj opremi ne smije biti estrogena.

Kriteriji prihvatljivosti

14. Agonističko i antagonističko djelovanje ispitivanih kemikalija ispituju se u nizovima ispitivanja. Niz ispitivanja sastoji se od najviše šest mikrotitracijskih ploča. Svaki niz ispitivanja sadržava najmanje jednu cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme, pozitivan kontrolni uzorak, negativan kontrolni uzorak i kontrole s otapalom. Na slikama 1. i 2. prikazan je raspored ploča za nizove ispitivanja agonizma i antagonizma.

15. Svako razrjeđivanje referentnih normi, ispitivane kemikalije, sve kontrole s otapalom te pozitivne i negativne kontrole treba analizirati u tri ponavljanja. Svaka analiza triju ponavljanja treba ispuniti zahtjeve navedene u tablici 3.A i tablici 4.A.
16. Cijela serija razrjeđivanja referentne norme (17β -estradiol za agonizam; tamoksifen za antagonizam) mjeri se na prvoj ploči u svakom nizu ispitivanja. Kako bi se rezultati analize preostalih pet mikrotitracijskih ploča mogli usporediti s prvom mikrotitracijskom pločom koja sadržava cijelu krivulju koncentracija – odgovor referentne norme, sve bi ploče trebale sadržavati tri kontrolna uzorka: kontrolu s otapalom, najvišu koncentraciju ispitane referentne norme i približnu koncentraciju EC_{50} (agonizam) ili IC_{50} (antagonizam) referentne norme. Omjer prosječnih kontrolnih uzoraka na prvoj ploči i preostalih pet ploča treba ispunjavati zahtjeve navedene u tablici 3.C (agonizam) ili tablici 4.C (antagonizam).
17. Za sve mikrotitracijske ploče u nizu ispitivanja računa se z-faktor (10.). Z-faktor treba izračunati upotrebom odgovora pri najvišoj i najnižoj koncentraciji referentne norme. Mikrotitracijska ploča smatra se valjanom ako ispunjava zahtjeve kako su navedeni u tablici 3.C (agonizam) ili tablici 4.C (antagonizam).
18. Referentna norma treba pokazati sigmoidnu krivulju doza – odgovor. EC_{50} ili IC_{50} izvedeni iz odgovora serije razrjeđivanja referentne norme trebaju ispunjavati zahtjeve kako su navedeni u tablici 3.C (agonizam) ili tablici 4.C (antagonizam).
19. Svaki niz ispitivanja treba sadržavati pozitivni i negativni kontrolni uzorak. Izračunana relativna indukcija i pozitivnog i negativnog kontrolnog uzorka treba ispunjavati zahtjeve kako su navedeni u tablici 3.C (agonizam) ili tablici 4.C (antagonizam).
20. Tijekom svih mjerenja faktor indukcije najviše koncentracije referentne norme treba izmjeriti tako da se prosječni najviši odgovor u obliku relativne jedinice svjetlosti (RLU) na referentnu normu 17β -estradiol podijeli prosječnim odgovorom u obliku RLU-a na referentnu kontrolu s otapalom. Taj faktor indukcije treba ispuniti minimalne zahtjeve za multiplikacijski faktor indukcije kako je navedeno u tablici 3.C (agonizam) ili tablice 4.C (antagonizam).
21. Valjanima se smatraju samo mikrotitracijske ploče koje ispunjavaju sve prethodno navedene kriterije prihvatljivosti i samo se one mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih kemikalija.
22. Kriteriji prihvatljivosti primjenjivi su i na predprobir i na iscrpne cikluse.

Tablica 1.

Koncentracije referentne norme, pozitivne kontrole (PC) i negativne kontrole (NC) za agonistički biotest CALUX

	Tvar	CAS br.	Raspon ispitivanja (M)
Referentna norma	17β -estradiol	50-28-2	$1 * 10^{-13} - 1 * 10^{-10}$
Pozitivna kontrola (PC)	17α -metiltestosteron	58-18-4	$3 * 10^{-6}$
Negativna kontrola (NC)	kortikosteron	50-22-6	$1 * 10^{-8}$

Tablica 2.

Koncentracije referentne norme, pozitivne kontrole (PC) i negativne kontrole (NC) za antagonistički biotest CALUX

	Tvar	CAS br.	Raspon ispitivanja (M)
Referentna norma	tamoksifen	10540-29-1	$3 * 10^{-9} - 1 * 10^{-5}$
Pozitivna kontrola (PC)	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	$1 * 10^{-9}$
Negativna kontrola (NC)	resveratrol	501-36-0	$1 * 10^{-5}$

Tablica 3.

Kriteriji prihvatljivosti za agonistički biotest ERα CALUX

A – pojedinačni uzorci na ploči		Kriterij
1	Najveći % standardne devijacije jažica s tri ponavljanja (za NC, PC, svako razrjeđivanje ispitivane kemikalije i referentne norme, osim C0)	< 15 %
2	Najveći % standardne devijacije jažica s tri ponavljanja (za kontrole s otapalom referentne norme i ispitivane kemikalije (C0, SC))	< 30 %
3	Najveće propuštanje LDH-a, kao mjera citotoksičnosti	< 120 %
B – unutar jedne mikrotitracijske ploče		
4	Omjer kontrole s otapalom referentne norme (C0; ploča 1) i kontrole s otapalom ispitivane kemikalije (SC; od ploče 2 do ploče x)	0,5 do 2,0
5	Omjer približ. vrijednosti EC ₅₀ i najviših koncentracija referentne norme na ploči 1 i približ. vrijednosti EC ₅₀ i najviših koncentracija referentne norme na ploči 2 do ploče x (C4, C8)	0,70 do 1,30
6	Z-faktor za svaku ploču	> 0,6
C – unutar jednog niza analiza (sve ploče u jednom nizu)		
7	Sigmoidna krivulja referentne norme	Da (17β-estradiol)
8	Raspon EC ₅₀ referentne norme 17β-estradiol	$4 * 10^{-12} - 4 * 10^{-11}$ M
9	Najmanji multiplikacijski faktor indukcije najviše koncentracije 17β-estradiola, s obzirom na kontrolu s otapalom referentne norme	5
10	Relativna indukcija (%) PC-a	> 30 %
11	Relativna indukcija (%) NC-a	< 10 %

Približ. približno; PC: pozitivna kontrola; NC: negativna kontrola; SC: kontrola s otapalom ispitivane kemikalije; C0: kontrola s otapalom referentne norme; SD: standardna devijacija; LDH: laktat dehidrogenaza.

Tablica 4.

Kriteriji prihvatljivosti za antagonistički biotest ERα CALUX

A – pojedinačni uzorci na ploči		Kriterij
1	Najveći % standardne devijacije trostrukih jažica (za NC, PC, svako razrjeđivanje ispitivane kemikalije i referentne norme, kontrolu s otapalom (C0))	< 15 %
2	Najveći % standardne devijacije trostrukih jažica (za kontrolu s nosačem (VC) i najvišu koncentraciju referentne norme (C8))	< 30 %
3	Najveće propuštanje LDH-a, kao mjera citotoksičnosti	< 120 %
B – unutar jedne mikrotitracijske ploče		
4	Omjer kontrole s otapalom referentne norme (C0; ploča 1) i kontrole s otapalom ispitivane kemikalije (SC; od ploče 2 do ploče x)	0,70 do 1,30
5	Omjer približ. vrijednosti IC ₅₀ koncentracija referentne norme na ploči 1 i približ. vrijednosti IC ₅₀ koncentracija referentne norme na ploči 2 do ploče x (C4)	0,70 do 1,30
6	Omjer najviših koncentracija referentne norme na ploči 1 i najviših koncentracija referentne norme na ploči 2 do ploče x (C8)	0,50 do 2,0
7	Z-faktor za svaku ploču	> 0,6
C – unutar jednog niza analiza (sve ploče u jednom nizu)		
8	Sigmoidna krivulja referentne norme	Da (tamoksifen)
9	Raspon IC ₅₀ referentne norme (tamoksifen)	$1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7}$ M
10	Najmanji multiplikacijski faktor indukcije kontrole s otapalom referentne norme, s obzirom na najvišu koncentraciju tamoksifena	2,5
11	Relativna indukcija (%) PC-a	< 70 %
12	Relativna indukcija (%) NC-a	> 85 %

Približ. približno; PC: pozitivna kontrola; NC: negativna kontrola; VC: kontrola s nosačem (kontrola s otapalom bez fiksne koncentracije referentne norme agonista); SC: kontrola s otapalom ispitivane kemikalije; C0: kontrola s otapalom referentne norme; SD: standardna devijacija; LDH: laktat dehidrogenaza.

Kontrola s otapalom/nosačem, referentne norme, pozitivne kontrole, negativne kontrole

23. I za ciklus predprobira i za iscrpne cikluse treba upotrebljavati istu kontrolu s otapalom/nosačem, referentne norme, pozitivne i negativne kontrole. Osim toga, koncentracija referentnih normi, pozitivnih i negativnih kontrola treba biti ista.

Kontrola s otapalom

24. Otapalo koje se upotrebljava za otapanje ispitivanih kemikalija treba ispitati kao kontrolu s otapalom. Tijekom validacije biotesta ER α CALUX kao nosač se upotrebljavao dimetilsulfoksid (DMSO, 1 % (v/v); CAS br. 67-68-5). Ako se upotrebljava otapalo koje nije DMSO, sve referentne norme, kontrole i ispitivane kemikalije treba ispitati u istom nosaču. Potrebno je napomenuti da kontrola s otapalom za antagonističke studije sadržava fiksnu koncentraciju 17 β -estradiola – referentne norme agonista (približno koncentracija EC₅₀). Kako bi se ispitalo otapalo koje se upotrebljava u antagonističkim studijama, treba pripremiti i ispitati kontrolu s nosačem.

Kontrola s nosačem (antagonizam)

25. Kod ispitivanja antagonizma medij za test obogaćuje se fiksnom koncentracijom 17 β -estradiola – referentne norme agonista (približno koncentracija EC₅₀). Kako bi se ispitalo otapalo koje se upotrebljava za otapanje ispitivanih kemikalija za antagonizam, treba pripremiti medij za test bez fiksne koncentracije 17 β -estradiola – referentne norme agonista. Taj se kontrolni uzorak označava kao kontrola s nosačem. Tijekom validacije biotesta ER α CALUX kao nosač se upotrebljavao dimetilsulfoksid (DMSO, 1 % (v/v); CAS br. 67-68-5). Ako se upotrebljava otapalo koje nije DMSO, sve referentne norme, kontrole i ispitivane kemikalije treba ispitati u istom nosaču.

Referentne norme

26. Referentnu normu agonista čini 17 β -estradiol (tablica 1.). Referente norme sastoje se od serije razrjeđivanja osam koncentracija 17 β -estradiola (1×10^{-13} , 3×10^{-13} , 1×10^{-12} , 3×10^{-12} , 6×10^{-12} , 1×10^{-11} , 3×10^{-11} , 1×10^{-10} M).
27. Referentnu normu antagonista čini tamoksifen (tablica 2.). Referente norme sastoje se od serije razrjeđivanja osam koncentracija tamoksifena (3×10^{-9} , 1×10^{-8} , 3×10^{-8} , 1×10^{-7} , 3×10^{-7} , 1×10^{-6} , 3×10^{-6} , 1×10^{-5} M). Svaka koncentracija referentne norme antagonista inkubira se zajedno s fiksnom koncentracijom 17 β -estradiola – referentnom normom agonista (3×10^{-12} M).

Pozitivna kontrola

28. Pozitivnu kontrolu za agonističke studije čini 17 α -metiltestosteron (tablica 1.).
29. Pozitivnu kontrolu za antagonističke studije čini 4-hidroksitamoksifen (tablica 2.). Pozitivna kontrola antagonista inkubira se zajedno s fiksnom koncentracijom 17 β -estradiola – referentnom normom agonista (3×10^{-12} M).

Negativna kontrola

30. Negativnu kontrolu za agonističke studije čini kortikosteron (tablica 1.).
31. Negativnu kontrolu za antagonističke studije čini resveratrol (tablica 2.). Negativna kontrola antagonista inkubira se zajedno s fiksnom koncentracijom 17 β -estradiola – referentnom normom agonista (3×10^{-12} M).

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija (vidjeti stavak 14. i tablice 3. i 4. u odjeljku „SASTAVNICE ER TA TESTA” ove ispitne metode)

Nosač

32. Otapalo koje se upotrebljava za otapanje ispitivanih kemikalija treba potpuno otopiti ispitivanu kemikaliju i mora se moći miješati s medijem za stanice. Primjerena su otapala DMSO, voda i etanol (čistoće od 95 % do 100 %). Ako se kao otapalo upotrebljava DMSO, najviša koncentracija DMSO-a tijekom inkubacije ne treba biti veća od 1 % (v/v). Otapalo prije upotrebe treba ispitati kako bi se utvrdilo da nije citotoksično i da ne utječe na uspješnost testa.

Priprema referentnih normi, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i ispitivanih kemikalija

33. Referentne norme, pozitivne kontrole, negativne kontrole i ispitivane kemikalije otapaju se u 100-postotnom DMSO-u (ili primjerenom otapalu). U istom otapalu zatim treba pripremiti i primjerena (serijska) razrjeđivanja. Prije otapanja sve tvari treba ostaviti tako da se njihova temperatura izjednači sa sobnom temperaturom. U svježe pripremljenim glavnim otopinama referentnih normi, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i ispitivanih kemikalija ne smije biti primjetan talog ili zamućenje. Uzorci referentne norme i kontrole mogu se pripremati zbirno. Prije svakog pokusa treba pripremiti glavne otopine ispitivanih kemikalija. Za svaki pokus treba pripremiti svježa konačna razrjeđivanja referentnih normi, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i ispitivanih kemikalija te ih treba upotrijebiti u roku od 24 sata od pripreme.

Topljivost, citotoksičnost i utvrđivanje raspona

34. Tijekom ciklusa predprobira utvrđuje se topljivost ispitivanih kemikalija u odabranom otapalu. Priprema se najviša koncentracija glavne otopine od 0,1 M. Ako se pri toj koncentraciji pojave poteškoće s topljivosti, treba pripremiti glavne otopine niže koncentracije dok se ispitivane kemikalije potpuno ne otope. Tijekom ciklusa predprobira ispituju se serijska razrjeđivanja ispitivane kemikalije u omjeru 1: 10. Najveća koncentracija u testu za ispitivanje agonista i antagonista iznosi 1 mM. Nakon predprobira izvodi se primjereni rafinirani raspon koncentracija za ispitivane kemikalije koji treba ispitati tijekom iscrpnih ciklusa. U iscrpnom ispitivanju trebaju se ispitati razrjeđivanja od 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x i 3000x.
35. Ispitivanje citotoksičnosti uključeno je u protokol za test agonista i antagonista (11.). Ispitivanje citotoksičnosti uključeno je i u ciklus predprobira i u iscrpne cikluse. Metoda upotrijebljena za procjenu citotoksičnosti tijekom validacije biotesta ERa CALUX bio je test propuštanja laktat dehidrogenaze (LDH) u kombinaciji s kvalitativnim vizualnim pregledom stanica (vidjeti Dodatak 4.1.) nakon izlaganja ispitivanim kemikalijama. Međutim, za utvrđivanje citotoksičnosti mogu se upotrijebiti druge kvantitativne metode (npr. kolorimetrijski test na temelju tetrazolija (MTT) ili biotest citotoksičnosti CALUX). Općenito, koncentracije ispitivane kemikalije koje pokazuju smanjenje vijabilnosti stanica veće od 20 % smatraju se citotoksičnima i stoga se ne mogu upotrijebiti za procjenu podataka. Kad je riječ o testu propuštanja LDH-a, koncentracija ispitivane kemikalije smatra se citotoksičnom ako je postotak propuštanja LDH-a veći od 120 %.

Izlaganje ispitivanoj kemikaliji i organizacija testne ploče

36. Nakon tripsinizacije konfluentne tikvice uzgojenih stanica, stanice se ponovno suspendiraju pri koncentraciji od 1 x 10⁵ stanica/ml u mediju za test bez estrogena. Sto µl stanica koje su ponovno suspendirane nasađuju se u unutarnje jažice mikrotitracijske ploče s 96 jažica. Vanjske jažice pune se s 200 µl fiziološke otopine puferirane fosfatnim puferom (PBS) (vidjeti slike 1. i 2.). Nasađene stanice predinkubiraju se 24 sata u inkubatoru CO₂ (5 % CO₂, 37 °C, 100-postotna vlažnost).
37. Nakon predinkubacije ploče se pregledavaju kako bi se vizualno utvrdile citotoksičnost (vidjeti Dodatak 4.1.), kontaminacija i konfluencija. Za ispitivanje se koriste samo ploče na kojima nema vizualnih znakova citotoksičnosti, kontaminacije i kod kojih konfluencija iznosi najmanje 85 %. Medij iz unutarnjih jažica pažljivo se uklanja i zamjenjuje s 200 µl medija za test bez estrogena koji sadržava primjerene serije razrjeđivanja referentnih normi, ispitivanih kemikalija, pozitivnih kontrola, negativnih kontrola i kontrola s otapalom (tablica 5.: studije agonista;

tablica 6.: studije antagonista). Sve referentne norme, ispitivane kemikalije, pozitivne kontrole, negativne kontrole i kontrole s otapalom ispituju se u tri ponavljanja. Na slici 1. prikazan je raspored na ploči za ispitivanje agonista. Na slici 2. prikazan je raspored na ploči za ispitivanje antagonista. Raspored na ploči za predprobir isti je kao i za iscrpno ispitivanje. Kod ispitivanja antagonista sve unutarnje jažice, osim jažica za kontrolu s nosačem (VC), sadržavaju i fiksnu koncentraciju 17β -estradiola – referentne norme agonista (3×10^{-12} M). Treba napomenuti da referentne norme C8 i C4 treba dodati svakoj ploči s ispitivanom kemikalijom.

38. Nakon izlaganja stanica svim kemikalijama, mikrotitracijske ploče s 96 jažica treba inkubirati još 24 sata u inkubatoru CO₂ (5 % CO₂, 37 °C, 100-postotna vlažnost).

Slika 1.

Raspored na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica za predprobir i procjenu agonističkog učinka

Plate 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Subsequent plates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = otapalo referentne norme.

C(1 – 8) = serije razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) referentne norme.

PC = pozitivna kontrola.

NC = negativna kontrola.

TCx-(1 – 8) = razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) ispitivane kemikalije za ciklus predprobira i procjenu agonističkog učinka ispitivane kemikalije x.

SC = kontrola s otapalom ispitivane kemikalije (po mogućnosti isto otapalo kao i pod C0, ali moguće iz druge šarže).

Siva polja: = vanjske jažice, napunjene s 200 µl PBS-a.

Slika 2.

Raspored na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica za antagonistički predprobir i procjenu antagonističkog učinka**Plate 1**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Subsequent plates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = otapalo referentne norme.

C(1 – 8) = serije razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) referentne norme.

NC = negativna kontrola.

PC = pozitivna kontrola.

TCx-(1 – 8) = razrjeđivanja (1 – 8, koncentracije od niže do više) ispitivane kemikalije za ciklus predprobira i procjenu agonističkog učinka ispitivane kemikalije x.

SC = kontrola s otapalom ispitivane kemikalije (po mogućnosti isto otapalo kao i pod C0, ali moguće iz druge šarže).

VC = kontrola s nosačem (kontrola s otapalom bez fiksne koncentracije referentne norme agonista – 17β-estradiola).

Siva polja: = vanjske jažice, napunjene s 200 μl PBS-a.

Napomena: sve unutarnje jažice, osim jažica za kontrolu s nosačem (VC), sadržavaju i fiksnu koncentraciju 17β-estradiola – referentne norme agonista ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Mjerenje luminiscencije

39. Mjerenje luminiscencije podrobno je opisano u protokolu za test agonista i antagonista (10.). Medij treba ukloniti iz jažica i stanice treba lizirati nakon 24 sata inkubacije kako bi se otvorila stanična membrana i omogućilo mjerenje aktivnosti luciferaze.
40. Kod mjerenja luminiscencije za taj je postupak potreban luminometar s dva ubrizgavača. Reakcija luciferaze pokreće se ubrizgavanjem supstrata luciferina. Reakcija se zaustavlja dodavanjem 0,2 M NaOH. Reakcija se zaustavlja kako bi se spriječilo prenošenje luminiscencije iz jedne jažice u drugu.
41. Emisija svjetlosti iz svake jažice izražava se kao relativna jedinica svjetlosti (RLU) po jažici.

Ciklus predprobira

42. Rezultati analize predprobira upotrebljavaju se za utvrđivanje rafiniranog raspona koncentracija ispitivanih kemikalija za iscrpna ispitivanja. Procjena rezultata analize predprobira i utvrđivanja rafiniranog raspona koncentracije ispitivanih kemikalija za iscrpno ispitivanje podrobno je opisana u protokolu za test agonista i antagonista (10.). Ovdje je naveden kratak sažetak postupaka za utvrđivanje raspona koncentracije ispitivanih kemikalija za ispitivanje agonista i antagonista. Smjernice o dizajnu serijskog razrjeđivanja potražiti u tablicama 5. i 6.

Odabir koncentracija za procjenu agonističkih učinaka

43. Tijekom ciklusa predprobira ispitivane kemikalije treba ispitati upotrebom serija razrjeđivanja kako je prikazano u tablicama 5. (agonizam) i 6. (antagonizam). Sve koncentracije treba ispitati u trostrukim jažicama u skladu s rasporedom na ploči kako je prikazano na slici 1. (agonizam) ili slici 2. (antagonizam).
44. Valjanima se smatraju samo rezultati analize koji ispunjavaju kriterije prihvatljivosti (tablica 3.) i samo se oni mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih kemikalija. Ako jedna mikrotitracijska ploča ili više mikrotitracijskih ploča u analitičkoj seriji ne ispune kriterije prihvatljivosti, te mikrotitracijske ploče treba ponovno analizirati. Ako prva ploča koja sadržava cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme ne ispuni kriterije prihvatljivosti, mora se ponovno analizirati cijeli niz ispitivanja (šest ploča).
45. Treba prilagoditi početne raspone koncentracija ispitivanih kemikalija i ponoviti ciklus predprobira:
- ako se uoči citotoksičnost. Postupak predprobira treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane kemikalije koje nisu toksične,
 - ako predprobir ispitivane kemikalije ne pokaže cijelu krivulju doza – odgovor jer ispitane koncentracije uzrokuju najveću indukciju. Ciklus predprobira treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane kemikalije.
46. Kada se opazi valjani odgovor na dozu, treba odabrati (najnižu) koncentraciju pri kojoj se opazi najveća indukcija i koja ne pokazuje citotoksičnost. Najviša koncentracija ispitivane kemikalije koju treba ispitati u iscrpnim ciklusima treba biti tri puta veća od te odabrane koncentracije.
47. Treba pripremiti cijelu rafiniranu seriju razrjeđivanja ispitivane kemikalije u skladu s koracima razrjeđivanja kako su navedeni u tablici 5., počevši od najviše koncentracije kako je prethodno utvrđena.
48. Ispitivanu kemikaliju koja ne izazove nikakav agonistički učinak treba ispitati u iscrpnim ciklusima, počevši od najviše koncentracije koja nije citotoksična, a koja je utvrđena tijekom predprobira.

Odabir koncentracija za procjenu antagonističkih učinaka

49. Valjanima se smatraju samo rezultati analize koji ispunjavaju kriterije prihvatljivosti (tablica 4.) i samo se oni mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih kemikalija. Ako jedna mikrotitracijska ploča ili više mikrotitracijskih ploča u analitičkoj seriji ne ispune kriterije prihvatljivosti, te mikrotitracijske ploče treba ponovno analizirati. Ako prva ploča koja sadržava cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme ne ispuni kriterije prihvatljivosti, mora se ponovno analizirati cijeli niz ispitivanja (šest ploča).
50. Treba prilagoditi početne raspone koncentracija ispitivanih kemikalija i ponoviti ciklus predprobira:
- ako se uoči citotoksičnost. Postupak predprobira treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane kemikalije koje nisu toksične,
 - ako predprobir ispitivane kemikalije ne pokaže cijelu krivulju doza – odgovor jer ispitane koncentracije uzrokuju najveću inhibiciju. Predprobir treba ponoviti s nižim koncentracijama ispitivane kemikalije.
51. Kada se pronade valjani odgovor na dozu treba odabrati (najnižu) koncentraciju pri kojoj se uoči najveća inhibicija i koja ne pokazuje citotoksičnost. Najviša koncentracija ispitivane kemikalije koju treba ispitati u iscrpnim ciklusima treba biti tri puta veća od te odabrane koncentracije.
52. Treba pripremiti cijelu rafiniranu seriju razrjeđivanja ispitivane kemikalije u skladu s koracima razrjeđivanja kako su navedeni u tablici 6., počevši od najviše koncentracije kako je prethodno utvrđena.
53. Ispitivane kemikalije koje ne izazovu nikakve antagonističke učinke treba ispitati u iscrpnim ciklusima, počevši od najviše koncentracije koja nije citotoksična, a koja je ispitana tijekom predprobira.

Iscrpní ciklusi

54. Nakon odabira rafiniranih raspona koncentracija ispitivane kemikalije treba iscrpno ispitati upotrebom serija razrjeđivanja kako je prikazano u tablicama 5. (agonizam) i 6. (antagonizam). Sve koncentracije treba ispitati u trostrukim jažicama u skladu s rasporedom na ploči kako je prikazano na slici 1. (agonizam) ili slici 2. (antagonizam).
55. Valjanima se smatraju samo rezultati analize koji ispunjavaju kriterije prihvatljivosti (tablice 3. i 4.) i samo se oni mogu koristiti za procjenu odgovora ispitivanih kemikalija. Ako jedna mikrotitracijska ploča ili više mikrotitracijskih ploča u analitičkoj seriji ne ispune kriterije prihvatljivosti, te mikrotitracijske ploče treba ponovno analizirati. Ako prva ploča koja sadržava cijelu seriju razrjeđivanja referentne norme ne ispuni kriterije prihvatljivosti, mora se ponovno analizirati cijeli niz ispitivanja (šest ploča).

Tablica 5.

Koncentracija i razrjeđivanja referentnih normi, kontrola i ispitivanih kemikalija koje se koriste za ispitivanje agonista

Referentni 17β-estradiol		TCx – ciklus predprobira –		TCx – iscrpni ciklus –		Kontrole	
konc. (M)		razrjeđivanje		razrjeđivanje		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	3 * 10 ⁻⁶
C1	1 * 10 ⁻¹³	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1 * 10 ⁻⁸
C2	3 * 10 ⁻¹³	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1 * 10 ⁻¹²	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	3 * 10 ⁻¹²	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	6 * 10 ⁻¹²	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1 * 10 ⁻¹¹	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3 * 10 ⁻¹¹	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1 * 10 ⁻¹⁰						

TCx – ispitivana kemikalija x
PC – pozitivna kontrola (17α-metiltestosteron)
NC – negativna kontrola (kortikosteron)
C0 – kontrola s otapalom referentne norme
SC – kontrola s otapalom ispitivane kemikalije

Tablica 6.

Koncentracija i razrjeđivanja referentnih normi, kontrola i ispitivanih kemikalija koje se koriste za ispitivanje antagonista

Referentni tamoksifen		TCx – ciklus predprobira –		TCx – iscrpni ciklus –		Kontrole	
konc. (M)		razrjeđivanje		razrjeđivanje		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 00-0 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1 * 10^{-9}$
C1	$3 * 10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1 * 10^{-5}$
C2	$1 * 10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3 * 10^{-8}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1 * 10^{-7}$	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3 * 10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	Obogaćeni agonist	
C6	$1 * 10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	konc. (M)	
C7	$3 * 10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiol	$3 * 10^{-12}$
C8	$1 * 10^{-5}$						

TCx – ispitivana kemikalija x

PC – pozitivna kontrola (4-hidroksitamoksifen)

NC – negativna kontrola (resveratrol)

C0 – kontrola s otapalom referentne norme

SC – kontrola s otapalom ispitivane kemikalije

VC – kontrola s nosačem (ne sadržava fiksnu koncentraciju 17β-estradiola – referentne norme agonista ($3,0 * 10^{-12}$ M))

Prikupljanje i analiza podataka

56. Nakon ciklusa predprobira i iscrpnih ciklusa treba utvrditi EC_{10} , EC_{50} , PC_{10} , PC_{50} i najveću indukciju (TCx_{max}) ispitivane kemikalije za agonističko ispitivanje. Za antagonističko ispitivanje treba izračunati IC_{20} , IC_{50} , PC_{80} , PC_{50} i najmanju indukciju (TCx_{min}). Na slikama 3. (agonizam) i 4. (antagonizam) nalazi se grafički prikaz tih parametara. Potrebni parametri računaju se na temelju relativne indukcije svake ispitivane kemikalije (u odnosu na najveću indukciju referentne norme (= 100 %)). Za procjenu podataka treba upotrebljavati nelinearnu regresiju (varijabilan nagib, četiri parametra) prema sljedećoj jednadžbi:

$$Y = dno + \frac{(vrh - dno)}{(1 + 10^{((\lg EC_{50} - X) \times \text{Hillov nagib}))}}$$

pri čemu je:

X = log doze ili koncentracije

Y = odgovor (relativna indukcija (%))

Vrh = najveća indukcija (%)

Dno = najmanja indukcija (%)

$\lg EC_{50}$ = log koncentracije pri kojoj se uočava 50 % najvećeg odgovora

Hillov nagib = faktor nagiba ili Hillov nagib

57. Neobrađene podatke iz luminometra, izražene kao relativne jedinice svjetlosti (RLU-ovi), treba prenijeti u proračunsku tablicu za analizu podataka koja je izrađena za cikluse predprobira i iscrpne cikluse. Neobrađeni podaci trebaju ispunjavati kriterije prihvatljivosti kako su navedeni u tablicama 3.A i 3.B (agonizam) ili 4.A i 4.B (antagonizam). Ako neobrađeni podaci ispunjavaju kriterije prihvatljivosti, provode se sljedeći koraci za izračun kako bi se utvrdili potrebni parametri.

Agonizam

- Oduzeti prosječni RLU kontrole s otapalom referentne norme od svakog sirovog podatka iz analize referentnih normi.
- Oduzeti prosječni RLU za kontrolu s otapalom ispitivane kemikalije od svakog sirovog podatka iz analize ispitivanih kemikalija.

- Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije referentne norme. Postaviti indukciju najviše koncentracije referentne norme na 100 %.
- Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije ispitivane kemikalije u usporedbi s najvišom koncentracijom referentne norme kao 100 %.
- Procijeniti rezultate analize nakon nelinearne regresije (varijabilan nagib, četiri parametra).
- Utvrditi EC_{50} i EC_{10} referentne norme.
- Utvrditi EC_{50} i EC_{10} ispitivanih kemikalija.
- Utvrditi najveću relativnu indukciju ispitivane kemikalije (TC_{max}).
- Utvrditi PC_{10} i PC_{50} ispitivanih kemikalija.

Kod ispitivanih kemikalija ne može se uvijek dobiti cijela krivulja doza – odgovor, na primjer zbog citotoksičnosti ili poteškoća s topljivosti. Stoga se ne mogu utvrditi vrijednosti EC_{50} , EC_{10} i PC_{50} . U tom se slučaju mogu utvrditi samo vrijednosti PC_{10} i TC_{max} .

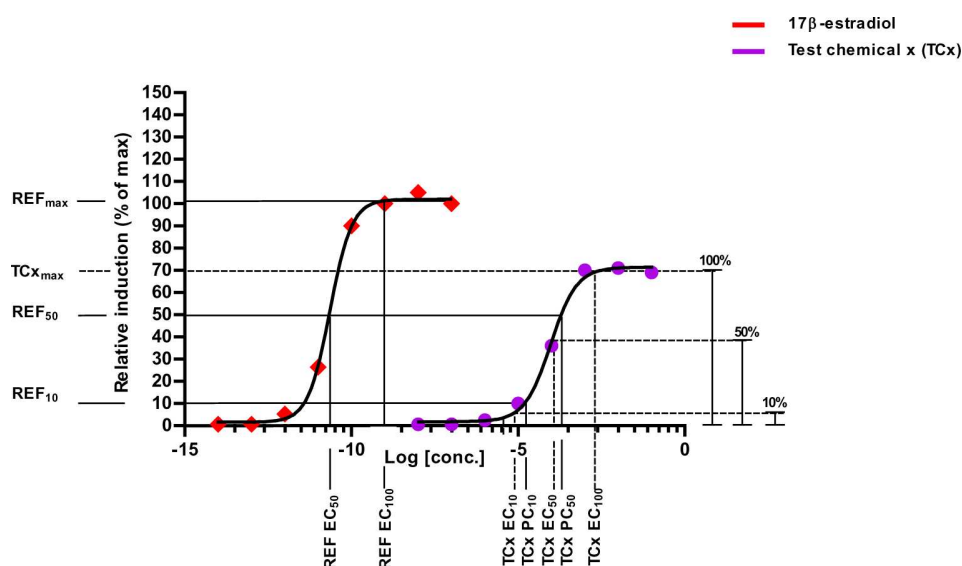
Antagonizam

- Oduzeti prosječni RLU najviše koncentracije referentne norme od svakog sirovog podatka iz analize referentnih normi.
- Oduzeti prosječni RLU najviše koncentracije referentne norme od svakog sirovog podatka iz analize ispitivanih kemikalija.
- Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije referentne norme. Postaviti indukciju najniže koncentracije referentne norme na 100 %.
- Izračunati relativnu indukciju svake koncentracije ispitivane kemikalije u usporedbi s najnižom koncentracijom referentne norme kao 100 %.

- Procijeniti rezultate analize nakon nelinearne regresije (varijabilan nagib, četiri parametra).
- Utvrditi IC_{50} i IC_{20} referentne norme.
- Utvrditi IC_{50} i IC_{20} ispitivanih kemikalija.
- Utvrditi najmanju relativnu indukciju ispitivane kemikalije (TC_{min}).
- Utvrditi PC_{80} i PC_{50} ispitivanih kemikalija.

Slika 3.

Pregled parametara koji se utvrđuju u testu agonista



EC_{10} = koncentracija tvari pri kojoj se opaža 10 % njezina najvećeg odgovora.

EC_{50} = koncentracija tvari pri kojoj se opaža 50 % njezina najvećeg odgovora.

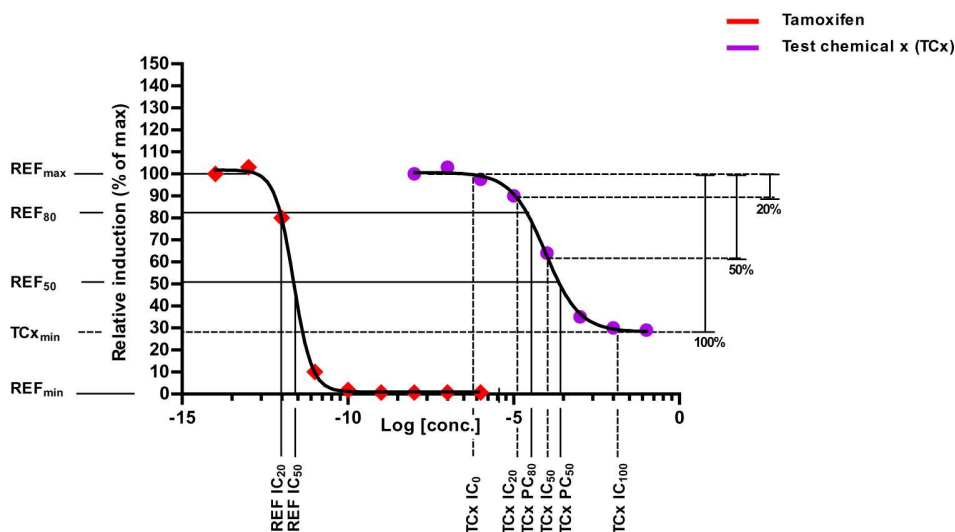
PC_{10} = koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je njezin odgovor jednak vrijednosti EC_{10} referentne norme.

PC_{50} = koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je njezin odgovor jednak vrijednosti EC_{50} referentne norme.

TCx_{max} = najveća relativna indukcija ispitivane kemikalije.

Slika 4.

Pregled parametara koji se utvrđuju u testu antagonista



IC_{20} = koncentracija tvari pri kojoj se opaža 80 % njezina najvećeg odgovora (20-postotna inhibicija).

IC_{50} = koncentracija tvari pri kojoj se opaža 50 % njezina najvećeg odgovora (50-postotna inhibicija).

PC_{80} = koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je njezin odgovor jednak vrijednosti IC_{20} referentne norme.

PC_{50} = koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je njezin odgovor jednak vrijednosti IC_{50} referentne norme.

TCx_{min} = najmanja relativna indukcija ispitivane kemikalije.

Kod ispitivanih kemikalija ne može se uvijek dobiti cijela krivulja doza – odgovor, na primjer zbog citotoksičnosti ili poteškoća s topljivosti. Stoga se ne mogu utvrditi vrijednosti IC_{50} , IC_{20} i PC_{50} . U tom se slučaju mogu utvrditi samo vrijednosti PC_{20} i TCx_{min} .

58. Rezultati se trebaju temeljiti na dva (ili tri) neovisna ciklusa. Ako se u dva ciklusa dobiju usporedivi, a time i ponovljivi rezultati, ne mora se provoditi treći ciklus. Da bi bili prihvatljivi, rezultati trebaju:

— ispunjavati kriterije prihvatljivosti (vidjeti stavke od 14. do 22. o kriterijima prihvatljivosti),

— biti ponovljivi.

Kriteriji za tumačenje podataka

59. Za tumačenje podataka i odluku o tome smatra li se ispitivana kemikalija pozitivnom ili negativnom treba primjenjivati sljedeće kriterije.

Agonizam

U svakom iscrpnom ciklusu ispitivana kemikalija smatra se **pozitivnom**:

1. ako je TC_{max} jednak ili veći od 10 % najvećeg odgovora referentne norme (REF_{10});
2. ako su najmanje dvije uzastopne koncentracije ispitivane kemikalije jednake vrijednosti REF_{10} ili veće od nje.

U svakom iscrpnom ciklusu ispitivana kemikalija smatra se **negativnom**:

1. ako TC_{max} nije veći od 10 % najvećeg odgovora referentne norme (REF_{10});
2. ako su manje od dvije koncentracije ispitivane kemikalije jednake vrijednosti REF_{10} ili veće od nje.

Antagonizam

U svakom iscrpnom ciklusu ispitivana kemikalija smatra se **pozitivnom**:

1. ako je TC_{min} jednak ili manji od 80 % najvećeg odgovora referentne norme (REF_{80} = 20-postotna inhibicija);
2. ako su najmanje dvije uzastopne koncentracije ispitivane kemikalije jednake vrijednosti REF_{80} ili manje od nje.

U svakom iscrpnom ciklusu ispitivana kemikalija smatra se **negativnom**:

1. ako je TC_{min} veći od 80 % najvećeg odgovora referentne norme (REF_{80} = 20-postotna inhibicija);
2. ako su manje od dvije koncentracije ispitivane kemikalije jednake vrijednosti REF_{80} ili manje od nje.

60. Kako bi se opisala jakost pozitivnog odgovora ispitivane kemikalije, treba navesti razmjer učinka (agonizam: TC_{max} ; antagonizam: TC_{min}) i koncentraciju pri kojoj dolazi do učinka (agonizam: EC_{10} , EC_{50} , PC_{10} , PC_{50} ; antagonizam: IC_{20} , IC_{50} , PC_{80} , PC_{50}).

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

61. Vidjeti stavak 20. odjeljka „SASTAVNICE ER TA TESTA”.

LITERATURA

1. OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ER α CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136.–148.
3. Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) α and not through ER β . *Endocrinology* 142(3), 1156.–1166.
4. Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology* 17(6):646.–57.
5. Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavallès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459.–1469.
6. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252.–4263.
7. Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 122, 204.–211.

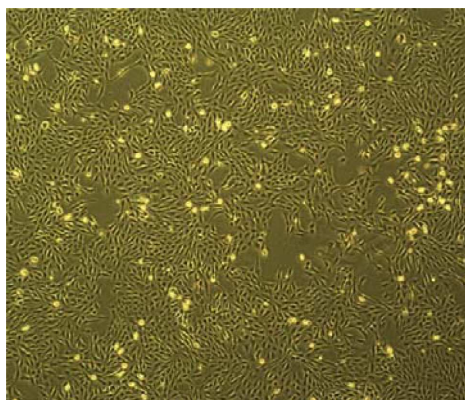
8. Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89(1), 173.–187.
9. Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769.–771.
10. Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Scr.*, 4, 67.–73.
11. Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Nizozemska.

Dodatak 4.1.

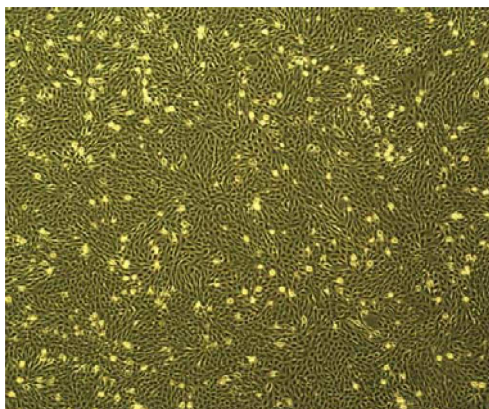
VIZUALNI PREGLED VIJABILNOSTI STANICA



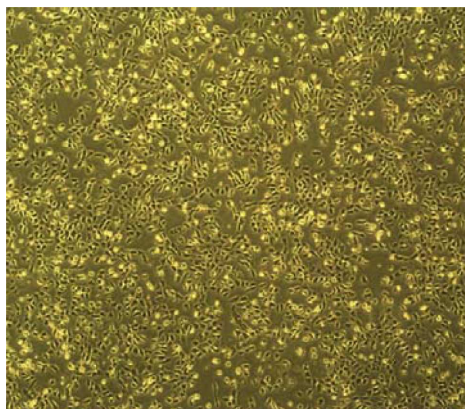
Konfluencija < 5 %. Stanice su tek nasadene. 100-postotna vijabilnost stanica. Razvrstavanje: „nije citotoksično”



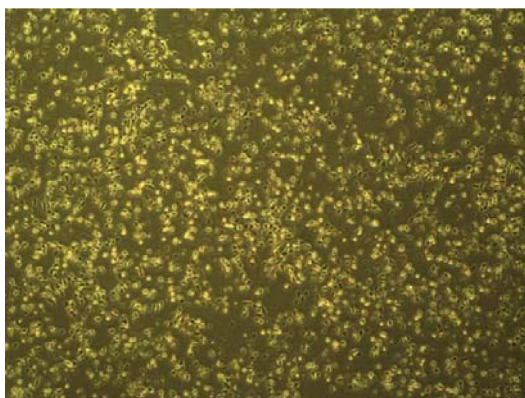
Konfluencija > 85 %. U ovoj se fazi stanice izlažu ispitivanim kemikalijama. Vijabilnost stanica > 95 %. Razvrstavanje: „nije citotoksično”



Konfluencija > 95 %. Stanice su sabijene i počinju prerastati. Vijabilnost stanica > 95 %. Razvrstavanje: „nije citotoksično”



Vijabilnost stanica < 25 %. Stanice se počinju odvajati i smanjuje se kontakt među stanicama. Stanice postaju okrugle. Razvrstavanje: „citotoksično”



Vijabilnost stanica < 5 %. Stanice su potpuno odvojene i prekinut je kontakt među stanicama. Stanice postaju okrugle. Razvrstavanje: „citotoksično”

B.67. IN VITRO ISPITIVANJA GENSKIH MUTACIJA STANICA SISAVACA UPOTREBOM GENA ZA TIMIDIN KINAZU**UVOD**

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 490 (2016.). Ispitne metode periodično se preispituju i revidiraju uzimajući u obzir znanstveni napredak, regulatorne potrebe i dobrobit životinja. Test limfoma miša (MLA) i test TK6 u kojima se upotrebljava lokus timidin kinaze (TK) izvorno su bili dio ispitne metode B.17. Kasnije je Stručna skupina za MLA Međunarodne radionice o ispitivanju genotoksičnosti (IWGT) razvila međunarodno usklađene preporuke za kriterije prihvatljivosti testova i tumačenje podataka za MLA (1., 2., 3., 4. i 5.) i te su preporuke uključene u ovu novu ispitnu metodu B.67. Ova je ispitna metoda napisana za MLA i za test TK6 jer se i u njemu upotrebljava lokus timidin kinaze. Dok se MLA često upotrebljava u regulatorne svrhe, TK6 se upotrebljava mnogo rjeđe. Treba napomenuti da te dvije stanične linije nisu međusobno zamjenjive unatoč sličnosti između krajnjih točaka te se u regulatornim programima s pravom može dati prednost jednoj od tih metoda za određenu regulatornu upotrebu. Na primjer, u validaciji testa MLA pokazala se primjerenost tog testa za otkrivanje genskih mutacija, ali i sposobnost ispitivanih kemikalija da induciraju strukturno oštećenje kromosoma. Ova je ispitna metoda dio niza ispitnih metoda u području genetske toksikologije. OECD je sastavio dokument u kojem se daju sažete informacije o ispitivanju u području genetske toksikologije te pregled novijih promjena smjernica OECD-a za ispitivanje genotoksičnosti (6.).
2. Svrha je *in vitro* testova genskih mutacija stanica sisavaca otkrivanje genskih mutacija induciranih (uzrokovanih) kemikalijama. Stanične linije koje se upotrebljavaju u ovim testovima mjere napredne mutacije na reporterskim genima, točnije genu za endogenu timidin kinazu (TK za ljudske stanice i Tk za stanice glodavaca, koje se u ovoj ispitnoj metodi zajedno nazivaju TK). Ova ispitna metoda namijenjena je za upotrebu s dvjema staničnim linijama: staničnom linijom limfoma miša L5178Y TK⁺/3.7.2C (obično se naziva L5178Y) i staničnom linijom ljudskih limfoblastoida TK6 (obično se naziva TK6). Iako se te dvije stanične linije razlikuju po svojem podrijetlu, rastu stanica, statusu p53 itd., testovi mutacija gena TK mogu se provesti na sličan način za obje vrste stanica, kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi.
3. Autosomalna i heterozigotna priroda gena za timidin kinazu omogućuje opažanje vijabilnih kolonija čijim stanicama nedostaje enzim timidin kinaza nakon mutacije iz TK^{+/+} u TK^{-/-}. Taj nedostatak može biti posljedica genetskih pojava koje utječu na gen TK, uključujući i genske mutacije (točkaste mutacije, mutacije pomaka okvira očitavanja, manje delecije itd.) i kromosomske pojave (velike delecije, premještanja kromosoma i mitotske rekombinacije). Potonje pojave eksprimiraju se kao gubitak heterozigotnosti, a to je uobičajena genetska promjena gena supresora tumora u karcinogenezi kod ljudi. U teoriji se testom MLA može otkriti gubitak cijelog kromosoma koji nosi gen TK, što je posljedica oštećenja diobenog vretena i/ili mitotskog nerazdvajanja. Doista, kombinacija citogenetske i molekularne analize jasno pokazuje da su neki mutanti TK u testu MLA posljedica nerazdvajanja. Međutim, analiza snage dokaza ukazuje na to da ispitivanja mutacija gena TK ne mogu pouzdano otkriti aneugene kada se primjenjuju standardni kriteriji citotoksičnosti (kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi) i stoga nije primjereno upotrebljavati te testove za otkrivanje aneugena (7., 8. i 9.).
4. U testovima mutacije gena TK nastaju dva različita razreda fenotipa mutanata TK: mutanti koji rastu normalno istom brzinom kao i heterozigotne stanice TK-a i mutanti koji rastu sporo i imaju produljeno vrijeme udvostručivanja. Mutanti koji rastu normalno i mutanti koji rastu sporo prepoznaju se kao mutanti u velikim kolonijama i mutanti u malim kolonijama u testu MLA te kao mutanti u kolonijama koje se javljaju rano i koje se javljaju kasno u testu TK6. Molekularna i citogenetska svojstva mutanata u velikim i malim kolonijama u testu MLA detaljno su ispitana (8., 10., 11., 12. i 13.). Detaljno su ispitana i molekularna i citogenetska svojstva mutanata koji se javljaju rano i koji se javljaju kasno u testu TK6 (14., 15., 16. i 17.). Mutanti koji rastu sporo za obje vrste stanica pretrpjeli su genetsko oštećenje koje pogađa gene koji navodno reguliraju rast u blizini lokusa timidin kinaze, što dovodi do produljenih vremena udvostručivanja i nastanka kolonija koje se javljaju kasno ili malih kolonija (18.). Indukcija mutanata koji rastu sporo povezuje se s kemikalijama koje izazivaju velike strukturne promjene na razini kromosoma. Stanice kojima nisu oštećeni geni koji navodno reguliraju rast u blizini lokusa timidin kinaze rastu brzinom koja je slična roditeljskim stanicama i postaju mutanti koji rastu normalno. Indukcija mutanata koji prvenstveno rastu normalno povezana je s kemikalijama koje prvenstveno djeluju kao mutageni koji uzrokuju točkaste mutacije. Stoga je od ključne važnosti izbrojiti i mutante koji rastu sporo i one koji rastu normalno kako bi se dobili svi mutanti i određeni uvid u vrste oštećenja (mutageni u odnosu na klastogene) koje inducira ispitivana kemikalija (10., 12., 18. i 19.).

5. Ispitna metoda organizirana je tako da se daju opće informacije koje se primjenjuju i na MLA i TK6 te specijalizirane smjernice za pojedinačne testove.
6. Upotrijebljene definicije navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

7. Testovi koji se obavljaju *in vitro* obično zahtijevaju primjenu egzogenog (vanjskog) izvora metaboličke aktivacije. Egzogenim sustavom metaboličke aktivacije ne oponašaju se u cijelosti *in vivo* uvjeti.
8. Trebalo bi voditi računa o tome da se izbjegnu uvjeti koji bi mogli dovesti do lažno pozitivnih rezultata (odnosno moguće interakcije s ispitnim sustavom) koji nisu uzrokovani interakcijom ispitivane kemikalije i genetskog materijala stanice; takvi uvjeti uključuju promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti, interakciju s komponentama medija (20. i 21.) ili prekomjerne razine citotoksičnosti (22., 23. i 24.). Citotoksičnost koja premašuje preporučene najviše razine citotoksičnosti, kako su definirane u stavku 28., smatra se prekomjernom za MLA i TK6. Osim toga, treba napomenuti da ispitivane kemikalije koje su analogne timidinu ili se ponašaju kao da su analogne timidinu mogu povećati učestalost pojave mutanata selektivnim rastom spontanijih pozadinskih mutanata tijekom tretiranja stanica te su za primjerenu procjenu potrebne dodatne ispitne metode (25.).
9. U slučaju proizvedenih nanomaterijala mogu biti potrebne posebne prilagodbe ove ispitne metode, ali one nisu opisane u ovoj ispitnoj metodi.
10. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni za ispitivanje smjese radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.
11. Mutirane stanice bez aktivnosti enzima timidin kinaze otporne su na citostatske učinke analoga primidona, trifluorotimidina (TFT), zbog mutacije $TK^{+/-}$ u $TK^{-/-}$. Stanice koje sadržavaju dosta TK -a osjetljive su na TFT, što uzrokuje inhibiciju staničnog metabolizma i sprečava daljnju diobu stanica. Tako se mutirane stanice uz prisutnost TFT-a mogu razmnožavati i stvarati vidljive kolonije, dok stanice koje sadržavaju enzim TK ne mogu.

NAČELO ISPITIVANJA

12. Stanice u suspenziji izlažu se u odgovarajućem trajanju ispitivanoj kemikaliji (vidjeti stavak 33.), s egzogenim izvorom metaboličke aktivacije i bez njega (vidjeti stavak 19.), te se zatim supkultiviraju da bi se utvrdila citotoksičnost i omogućila fenotipska ekspresija prije selekcije mutanata. Citotoksičnost se utvrđuje relativnim ukupnim rastom (RTG – vidjeti stavak 25.) za MLA i relativnom stopom preživljavanja (RS – vidjeti stavak 26.) za TK6. Tretirane se kulture drže u mediju za rast tijekom dovoljno dugog razdoblja, koje je karakteristično za svaki tip stanice (vidjeti stavak 37.), što omogućuje skoro optimalnu fenotipsku ekspresiju induciranih mutacija. Nakon fenotipske ekspresije učestalost pojave mutanata utvrđuje se nasadijavanjem poznatog broja stanica u medij koji sadržava selektivni agens kako bi se otkrile kolonije mutanata odnosno u medij bez selektivnog agensa kako bi se odredila učinkovitost kloniranja (vijabilnost). Nakon odgovarajućeg razdoblja inkubacije kolonije se prebroje. Učestalost pojave mutanata računa se na temelju broja kolonija mutanata koji se ispravlja učinkovitošću kloniranja u trenutku selekcije mutanata.

OPIS METODE

Pripreme

Stanice

13. Za MLA: budući da je MLA razvijen i opisan za upotrebu podlinije $TK^{+/-}$ –3.7.2C stanica L5178Y, za MLA se mora upotrebljavati upravo ta podlinija. Stanična linija L5178Y izvedena je iz limfoma timusa DBA-2 miša induciranog metilkolantrenom (26.). Clive i suradnici tretirali su stanice L5178Y (koje je Clive odredio kao $TK^{+/-}$ –3) etil metansulfonatom i izolirali klon $TK^{-/-}$ (određen kao $TK^{-/-}$ –3.7) primjenom bromodeoksiuridina kao selektivnog agensa. Iz klona $TK^{-/-}$ izolirani su spontani klon $TK^{+/-}$ (određen kao $TK^{+/-}$ –3.7.2.) i podklon (određen kao $TK^{+/-}$ –3.7.2C) te su opisani za upotrebu u testu MLA (27.). Objavljen je kariotip za staničnu liniju (28., 29., 30. i 31.). Modalni je broj kromosoma 40. Postoji jedan metacentrični kromosom (t12;13) koji treba brojiti kao jedan

kromosom. Lokus timidin kinaze miša nalazi se na distalnom kraju kromosoma 11. Stanična linija L5178Y TK⁺/⁻-3.7.2C ima mutacije na oba alela p53 i proizvodi protein mutanta p53 (32. i 33.). Status p53 stanične linije TK⁺/⁻-3.7.2C vjerojatno omogućuje da se testom otkrije veliko oštećenje (17.).

14. Za TK6: TK6 je stanična linija ljudskih limfoblastoida. Roditeljsku staničnu liniju čini WI-L2, stanična linija transformirana Epstein-Barrovim virusom, koja je izvorno izvedena iz petogodišnjeg mušjaka s hereditarnom sferocitozom. Prvi izolirani klon, HH4, mutageniran je mutagenom ICR191 i stvorena je heterozigotna stanična linija TK-a – TK6 (34.). Stanice TK6 skoro su diploidne i reprezentativni je kariotip 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35.). Lokus ljudske timidin kinaze nalazi se na dugom kraku kromosoma 17. TK6 je stanična linija kompetentna u pogledu p53 jer ima slijed p53 divljeg tipa na oba alela i eksprimira samo protein p53 divljeg tipa (36.).
15. I kod testa MLA i testa TK6 preporučuje se da laboratorij koji obavlja ispitivanje osigura odsustvo kontaminacije mikoplazmom, odredi kariotip stanica ili oboji kromosome koji imaju lokus timidin kinaze te da provjeri vremena udvostručenja populacije kada se glavni uzorak prvi put stvara ili nadopunjuje. Trebalo bi utvrditi uobičajeno trajanje staničnog ciklusa upotrijebljenih stanica u ispitnom laboratoriju i ono bi trebalo biti usklađeno s objavljenim svojstvima stanica (16., 19. i 37.). Taj glavni uzorak treba pohraniti na temperaturi od -150 °C ili nižoj i upotrebljavati za pripremu svih radnih uzoraka stanica.
16. Prije stvaranja velikog broja krioprezerviranih radnih uzoraka ili neposredno prije upotrebe u pokusu iz kultura će možda trebati odstraniti mutirane stanice koje postoje otprije [osim ako je učestalost pojave mutanata (MF) u kontroli s otapalom već unutar prihvatljivog raspona – vidjeti tablicu 2. za test MLA)]. To se postiže upotrebom metotreksata (aminopterin) kako bi se izdvojile stanice koje ne sadržavaju timidin kinazu te dodavanjem timidina, hipoksantina i glicina (L5178Y) ili 2'-deoksicitidina (TK6) kulturi kako bi se osigurao optimalan rast stanica kompetentnih u pogledu timidin kinaze (19., 38., 39. i 40.) za test TK6. Opći savjeti o dobroj praksi za održavanje staničnih kultura i savjeti specifični za stanice L5178Y i TK6 mogu se naći u literaturi (19., 31., 37., 39. i 41.). Za laboratorije koji trebaju matične uzorke za započinjanje testa MLA ili TK6 ili za dobivanje novih matičnih uzoraka dostupan je repozitorij stanica koje su dobro opisane (37.).

Uvjeti koje moraju zadovoljavati mediji i kulture

17. U oba bi testa u svrhu održavanja kultura trebalo primijeniti prikladne uvjete za medij za uzgoj kulture i uvjete inkubacije (npr. posude za kulture, vlažne atmosferske uvjete od 5 % CO₂ i temperaturu inkubacije od 37 °C). Stanične kulture uvijek bi se trebale održavati u uvjetima kojima se osigurava da one rastu u logaritamskoj fazi. Posebno je važno odabrati uvjete u pogledu medija i kultura kojima se osiguravaju optimalan rast stanica tijekom razdoblja ekspresije i kloniranje kako mutiranih tako i nemutiranih stanica. Za MLA i TK6 važno je i da uvjeti kulture osiguraju optimalan rast TK mutanata i u velikim kolonijama/mutanata koji se javljaju rano i mutanata u malim kolonijama/mutanata koji se javljaju kasno. Više pojedinosti o kulturi, uključujući potrebu da se konjski serum pravilno inaktivira toplinom ako se tijekom selekcije mutanata upotrebljava medij RPMI, dostupno je u literaturi (19., 31., 38., 39., 40. i 42.).

Priprema kultura

18. Stanice se razmnožavaju iz matičnih kultura te se nasađuju u medij za uzgoj kulture takvom gustoćom da kulture u suspenziji nastave eksponencijalno rasti tijekom razdoblja tretiranja i ekspresije.

Metabolička aktivacija

19. Kod uporabe stanica L5178Y i TK6 trebalo bi upotrebljavati egzogene sustave metaboličkog djelovanja jer te stanice nemaju odgovarajuću endogenu metaboličku sposobnost. Sustav koji se najčešće upotrebljava i automatski preporučuje, osim ako je drukčije opravdano, jest postmitohondrijska frakcija s dodanim kofaktorom (S9), pripravljena od jetre glodavaca (općenito štakora), koja je bila tretirana sredstvima za indukciju enzima, kao što je Aroclor 1254 (43., 44. i 45.), ili mješavinom fenobarbitala i β-naftoflavona (46., 47., 48., 49., 50. i 51.). Upotreba navedene smjese nije u suprotnosti sa Stockholmskom konvencijom o postojanim organskim onečišćujućim tvarima (52.) i dokazano je da

je jednako učinkovita za indukciju oksidaza s miješanom funkcijom kao Aroclor 1254 (45., 46., 47., 48. i 49.). Frakcija S9 obično se upotrebljava u koncentracijama u rasponu od 1 do 2 %, ali može se povećati na 10 % (v/v) u konačnom ispitnom mediju. Na odabir vrste i koncentracije upotrijebljenog egzogenog sustava metaboličke aktivacije ili metaboličkog pokretača može utjecati kategorija ispitivanih kemikalija.

Priprema ispitivane kemikalije

20. Prije tretiranja stanica krute ispitivane kemikalije trebalo bi pripremiti u prikladnim otapalima i prema potrebi razrijediti (vidjeti stavak 21.). Tekuće ispitivane kemikalije mogu se dodati izravno u ispitni sustav i/ili razrijediti prije tretiranja ispitnog sustava. Plinovite ili hlapljive ispitivane kemikalije trebalo bi ispitivati nakon što se prikladno izmijene standardni protokoli, kao što je tretiranje u hermetički zatvorenim posudama za kulture (53., 54. i 55.). Ispitivanu kemikaliju potrebno je pripremiti neposredno prije tretiranja, osim ako je prema podacima o stabilnosti prihvatljivo skladištenje.

ISPITNI UVJETI

Otapala

21. Otapalo bi trebalo odabrati tako da se optimizira topljivost ispitivane kemikalije bez negativnih učinaka na provedbu testa, kao što su npr. promjena rasta stanica, učinak na integritet ispitivane kemikalije, reagiranje s posudama za kulture ili oštećenje sustava metaboličke aktivacije. Preporučuje se da se, kada god je to moguće, prvo uzme u obzir upotreba vodenog otapala (ili medija za uzgoj kulture). Uobičajena su otapala voda ili dimetilsulfoksid. Općenito, organska otapala ne bi trebala prelaziti 1 % (v/v), dok vodena otapala (fiziološka otopina ili voda) ne bi trebala prelaziti 10 % (v/v) u mediju za završno tretiranje. Upotrebu neuobičajenih otapala (npr. etanola ili acetona) potrebno je opravdati podacima koji govore da su ta otapala kompatibilna s ispitivanim kemikalijama i ispitnim sustavom te da ne djeluju genotoksično pri upotrijebljenoj koncentraciji. Ako ne postoje takvi popratni podaci, važno je dodati netretirane kontrole (vidjeti Dodatak 1., Definicije) kako bi se dokazalo da odabrano otapalo nema štetne ili mutagene učinke.

MJERENJE CITOTOKSIČNOSTI I ODABIR KONCENTRACIJA TRETIRANJA

22. Pri utvrđivanju najviše koncentracije ispitivane kemikalije trebalo bi izbjegavati koncentracije koje imaju sposobnost izazivanja lažno pozitivnih odgovora, kao što su koncentracije koje izazivaju prekomjernu citotoksičnost (vidjeti stavak 28.), taloženje u mediju za uzgoj kulture (vidjeti stavak 29.) ili znatne promjene pH-vrijednosti ili osmolalnosti (vidjeti stavak 8.). Ako ispitivana kemikalija u trenutku dodavanja uzrokuje znatnu promjenu pH-vrijednosti medija, pH-vrijednost može se prilagoditi puferiranjem medija za završno tretiranje kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati te održali primjereni uvjeti za uzgoj kulture.
23. Odabir koncentracije temelji se na citotoksičnosti i drugim razmatranjima (vidjeti stavke 27.–30.). Iako ocjena citotoksičnosti u početnom ispitivanju može biti korisna za bolje određivanje koncentracija koje će se upotrebljavati u glavnom pokusu, početno ispitivanje nije potrebno. Čak i ako se provodi početna ocjena citotoksičnosti, i dalje je obvezno mjerenje citotoksičnosti za svaku kulturu u glavnom pokusu. Ako se provodi pokus za utvrđivanje raspona, on treba obuhvatiti širok raspon koncentracija i može se završiti 1. dana nakon tretiranja ili nastaviti na 2. dan ekspresije i do selekcije mutanata (ako se pokaže da su upotrijebljene koncentracije primjerene).
24. Citotoksičnost treba utvrditi za svaku pojedinačnu ispitnu kulturu i kontrolnu kulturu: metode za MLA (2.) i TK6 (15.) utvrđene su međunarodno prihvaćenom praksom.
25. I za verziju testa MLA s agarom i s mikrožajicama citotoksičnost treba procijeniti upotrebom relativnog ukupnog rasta (RTG), koji su izvorno definirali Clive i Spector 1975. (2.). Ta mjera uključuje relativni rast u suspenziji (RSG: ispitna kultura u usporedbi s kontrolom s otapalom) tijekom tretiranja stanica, vrijeme ekspresije i relativnu učinkovitost kloniranja (RCE: ispitna kultura u usporedbi s kontrolom s otapalom) u trenutku odabira mutanata (2.). Treba napomenuti da RSG obuhvaća bilo kakav gubitak stanica do kojeg dolazi u ispitnoj kulturi tijekom tretiranja (formule potražiti u Dodatku 2.).

26. Za TK6: citotoksičnost bi se trebala ocjenjivati primjenom relativne stope preživljavanja (RS), tj. učinkovitosti kloniranja stanica koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja, na temelju broja stanica u usporedbi s negativnom kontrolom (kojoj se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %) (formulu vidjeti u Dodatku 2.).
27. Potrebno je ocijeniti najmanje četiri ispitne koncentracije (ne uključujući kontrolu s otapalom i pozitivnu kontrolu) koje ispunjavaju kriterije prihvatljivosti (odgovarajuća citotoksičnost, broj stanica itd.). Iako se preporučuje upotreba usporednih kultura, za svaku se ispitivanu koncentraciju može upotrijebiti samo jedna tretirana kultura ili više njezinih ponovljenih uzoraka. Rezultati dobiveni iz ponovljenih kultura pri određenoj koncentraciji trebali bi se navoditi odvojeno, ali mogu se objediniti radi analize podataka (55.). Za ispitivane kemikalije koje pokazuju malu ili nikakvu citotoksičnost uglavnom će biti prikladne približno dvostruke ili trostruke koncentracije. Ako se pojavi citotoksičnost, treba odabrati koncentracije koje obuhvaćaju raspon citotoksičnosti od koncentracije koja uzrokuje citotoksičnost kako je opisano u stavku 28. te uključujući koncentracije pri kojima se javlja umjerena citotoksičnost i one pri kojima je citotoksičnost mala ili je nema. Mnoge ispitivane kemikalije imaju oštre krivulje odgovora na koncentraciju te će za obuhvaćanje cijelog raspona citotoksičnosti ili podrobno istraživanje odgovora na koncentracije možda biti potrebno upotrijebiti sličnije koncentracije i više od četiri koncentracije, posebno u situacijama u kojima je potrebno ponavljanje pokusa (vidjeti stavak 70.). Upotreba više od četiri koncentracije može biti osobito važna kada se upotrebljava jedna kultura.
28. Ako se maksimalna koncentracija temelji na citotoksičnosti, najvećom koncentracijom trebao bi se nastojati ostvariti relativni ukupni rast od 20 do 10 % za MLA i relativna stopa preživljavanja od 20 do 10 % za TK6 (stavak 67.).
29. Za slabo topljive ispitivane kemikalije koje nisu citotoksične pri koncentracijama nižima od najniže koncentracije pri kojoj kemikalija nije topljiva najviša bi analizirana koncentracija trebala dovesti do zamućenosti ili taloga vidljivog golim okom ili inverznim mikroskopom na kraju tretiranja ispitivanom kemikalijom. Čak i ako se citotoksičnost pojavi iznad najniže netopljive koncentracije, preporučuje se ispitivanje pri samo jednoj koncentraciji koja dovodi do zamućenja ili s vidljivim talogom jer lažni učinci mogu biti posljedica taloga. Budući da se u testovima MLA i TK6 upotrebljavaju kulture u suspenziji, posebnu pozornost treba posvetiti tome da se osigura da talog ne utječe na izvođenje ispitivanja. Može biti korisno i odrediti topljivost u mediju za uzgoj kulture prije izvođenja pokusa.
30. Ako nisu uočeni talog ili ograničavajuća citotoksičnost, najviša ispitna koncentracija trebala bi odgovarati najnižoj od sljedećih vrijednosti: 10 mM, 2 mg/ml ili 2 µl/ml (57. i 58.). Ako sastav ispitivane kemikalije nije definiran, npr. ako je riječ o tvarima nepoznatog ili promjenjivog sastava, složenim reakcijskim proizvodima ili biološkim materijalima (tj. kemijske tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava ili UVCB tvari), proizvodima ekstrahiranim iz okoliša itd., najvišu koncentraciju može biti potrebno povećati (npr. 5 mg/ml) u odsustvu dovoljne citotoksičnosti, a kako bi se povećala koncentracija svakog sastojka. Međutim, trebalo bi napomenuti da ti zahtjevi mogu biti drukčiji za farmaceutске proizvode namijenjene ljudima (59.).

Kontrole

31. Kod svakog uvjeta pokusa potrebno je uključiti i istodobne negativne kontrole (vidjeti stavak 21.) koje se sastoje samo od otapala u mediju za tretiranje i koje su tretirane na isti način kao i kulture za tretiranje.
32. Istodobne pozitivne kontrole potrebne su za dokazivanje sposobnosti laboratorija za određivanje mutagena u uvjetima upotrijebljenog protokola ispitivanja, učinkovitosti egzogenog sustava metaboličke aktivacije (ako je primjenjivo) i za dokazivanje primjerenog otkrivanja i malih TK mutanata/mutanata koji se javljaju kasno i velikih TK mutanata/mutanata koji se javljaju rano. Primjeri pozitivnih kontrola navedeni su u tablici 1. u nastavku. Ako je to opravdano, mogu se koristiti alternativne tvari za pozitivnu kontrolu. S obzirom na to da je *in vitro* ispitivanje genotoksičnosti na stanicama sisavaca u dostatnoj mjeri standardizirano za kratkotrajna tretiranja (od tri do četiri sata) koja se istodobno provode s metaboličkom aktivacijom i bez nje uz isto trajanje tretiranja, upotreba pozitivnih kontrola može se ograničiti na mutagene tvari koje zahtijevaju metaboličku aktivaciju. U tom će slučaju taj jedan odgovor pozitivne kontrole dokazati djelovanje sustava metaboličke aktivacije i osjetljivost ispitnog sustava. Ako se upotrebljava, dugotrajno tretiranje (tj. 24 sata bez S9) trebalo bi imati svoju pozitivnu kontrolu jer će se trajanje tretiranja razlikovati od ispitivanja u kojem se primjenjuje metabolička aktivacija. Svaku pozitivnu kontrolu trebalo bi primijeniti pri jednoj ili više koncentracija za koje se očekuje da će dovesti do ponovljivih i zamjetnih povećanja u odnosu na pozadinu kako bi se dokazala osjetljivost ispitnog sustava, a odgovor ne bi trebala dovesti u pitanje citotoksičnost koja prelazi granične vrijednosti utvrđene u ovoj ispitnoj metodi (vidjeti stavak 28.).

Tablica 1.

Referentne tvari preporučene za ocjenu osposobljenosti laboratorija i za odabir pozitivnih kontrola

Kategorija	Tvar	CAS br.
1. Mutageni aktivni bez metaboličke aktivacije		
Metil metansulfonat		66-27-3
Mitomycin C		50-07-7
4-nitrokinolin-N-oksidi		56-57-5
2. Mutageni koji zahtijevaju metaboličku aktivaciju		
Benzo(a)piren		50-32-8
Ciklofosfamid (monohidrat)		50-18-0 (6055-19-2)
7,12-dimetilbenzantracen		57-97-6
3-metilkolantren		56-49-5

POSTUPAK

Tretiranje ispitivanom kemikalijom

33. Stanice koje se razmnožavaju tretiraju se ispitivanom kemikalijom uz prisustvo i odsustvo sustava metaboličke aktivacije. Izlaganje treba trajati odgovarajuće vrijeme (obično je primjereno od tri do četiri sata). Međutim, trebalo bi napomenuti da ti zahtjevi mogu biti drukčiji za farmaceutske proizvode namijenjene ljudima (59.). Kod testa MLA u slučajevima kada se kratkotrajnim tretiranjem dobiju negativni rezultati, a postoje informacije koje ukazuju na potrebu za duljim tretiranjem (npr. nukleozidni analozi, slabo topljive kemikalije (5. i 59.)), treba razmotriti provođenje testa s duljim tretiranjem, tj. 24 sata bez S9.
34. Minimalni broj stanica koje se koriste za svaku ispitnu kulturu (kontrolnu i tretiranu) u svakoj fazi ispitivanja trebao bi se temeljiti na učestalosti pojave spontanih mutanata. Opća je smjernica tretirati i pasажirati dovoljno stanica u svakoj pokusnoj kulturi kako bi se održalo najmanje deset, ali po mogućnosti 100 spontanih mutanata u svim fazama testa (tretiranje, fenotipska ekspresija i selekcija mutanata) (56.).
35. Za test MLA preporučuje se prihvatljiva učestalost spontanih mutanata od $35\text{--}140 \times 10^{-6}$ (verzija s agarom) i $50\text{--}170 \times 10^{-6}$ (verzija s mikrojažicama) (vidjeti tablicu 2.). Da bi se dobilo najmanje deset, a po mogućnosti 100 spontanih mutanata koje će preživjeti tretiranje, za svaku ispitnu kulturu treba tretirati najmanje 6×10^6 stanica. Tretiranjem tog broja stanica i održavanjem dovoljnog broja stanica tijekom ekspresije i kloniranja za selekciju mutanata dobiva se dovoljan broj spontanih mutanata (deset ili više) tijekom svih faza pokusa, čak i za kulture tretirane pri koncentracijama koje uzrokuju 90-postotnu citotoksičnost (kako je izmjereno relativnim ukupnim rastom od 10 %) (19., 38. i 39.).
36. Za test TK6 učestalost spontanih mutanata općenito iznosi od 2 do 10×10^{-6} . Da bi se dobilo najmanje deset spontanih mutanata koje će preživjeti tretiranje, za svaku kulturu treba tretirati najmanje 20×10^6 stanica. Tretiranjem tog broja stanica dobiva se dovoljan broj spontanih mutanata (deset ili više), čak i za kulture tretirane pri koncentracijama koje uzrokuju 90-postotnu citotoksičnost tijekom tretiranja (relativna stopa preživljavanja od 10 %). Osim toga, mora se kultivirati dovoljan broj stanica tijekom razdoblja ekspresije i nasaditi radi selekcije mutanata (60.).

Vrijeme fenotipske ekspresije i mjerenje citotoksičnosti i učestalosti pojave mutanata

37. Na kraju razdoblja tretiranja stanice se kultiviraju u zadanom vremenskom razdoblju kako bi se omogućila gotovo optimalna fenotipska ekspresija novoinduciranih mutacija; specifično za svaku staničnu liniju. Za test MLA razdoblje fenotipske ekspresije iznosi dva dana. Za test TK6 razdoblje fenotipske ekspresije iznosi od tri do četiri dana. Ako se upotrebljava tretiranje u trajanju od 24 sata, razdoblje ekspresije počinje nakon kraja tretiranja.
38. Tijekom razdoblja fenotipske ekspresije stanice se prebrojavaju svakog dana. Kod testa MLA svakodnevno brojanje stanica upotrebljava se za izračun svakodnevnog rasta u suspenziji (SG). Nakon dvodnevno razdoblja ekspresije stanice se suspendiraju u mediju sa selektivnim agensom ili bez njega radi utvrđivanja broja mutacija (ploče za odabir) i učinkovitosti kloniranja (ploče za vijabilnost). Za test MLA postoje dvije jednako prihvatljive metode za kloniranje selekcije mutanata; u jednoj se upotrebljava meki agar, a u drugom tekući medij u pločama s 96 jažica (19., 38. i 39.). Kloniranje u testu TK6 provodi se upotrebom tekućih medija i ploča s 96 jažica (16.).
39. Za TK mutante kao selektivni agens preporučuje se samo trifluorotimidin (TFT) (61).
40. Kod testa MLA agarne ploče i ploče s mikrojažicama prebrojavaju se nakon 10–12 dana inkubacije. Kod testa TK6 kolonije u pločama s mikrojažicama ocjenjuju se nakon 10–14 dana kako bi se uočili mutanti koji se javljaju rano. Kako bi se obnovili TK6 mutanti koji rastu sporo (koji se javljaju kasno), stanicama treba ponovno dodati medij za uzgoj i TFT nakon što se prebroje mutanti koji se javljaju rano i zatim inkubirati ploče dodatnih 7–10 dana (62.). Za pojedinosti o prebrojavanju TK mutanata koji rastu sporo i onih koji rastu normalno vidjeti stavke 42. i 44.
41. Odgovarajući izračuni za dva testa, uključujući i dvije metode (agar i mikrojažice) za test MLA, nalaze se u Dodatku 2. Kod metode testa MLA u kojoj se upotrebljava agar, za izračun učestalosti pojave mutanata kolonije se prebrojavaju i broj kolonija mutanata prilagođava se s obzirom na učinkovitost kloniranja. Kod verzije testova MLA i TK6 s mikrojažicama, učinkovitost kloniranja i za ploče za selekciju i za ploče za učinkovitost kloniranja (63.) utvrđuje se u skladu s Poissonovom distribucijom. Učestalost pojave mutanata računa se iz tih dviju učinkovitosti kloniranja.

Opis kolonije mutanata

42. Kod testa MLA, ako je ispitivana kemikalija pozitivna (vidjeti stavke od 62. do 63.), opisivanje kolonije razvrstavanjem po veličini kolonije ili po njezinom rastu treba provesti na najmanje jednoj od ispitnih kultura (obično najviša prihvatljiva pozitivna koncentracija) te na negativnim i pozitivnim kontrolama. Ako je ispitivana kemikalija negativna (vidjeti stavak 64.), opisivanje kolonije mutanata treba provesti na negativnim i pozitivnim kontrolama. Kod metode testa MLA s mikrojažicama mutanti koji tvore male kolonije definiraju se kao mutanti koji prekrivaju manje od 25 % promjera jažice, a mutanti koji tvore velike kolonije kao oni koji prekrivaju više od 25 % promjera jažice. Kod metode s agarom za prebrojavanje kolonija mutanata i razvrstavanje kolonija po veličini upotrebljava se automatski brojač kolonija. pristupi razvrstavanju kolonija po veličini detaljno su opisani u literaturi (19., 38. i 40.). Opis kolonija na negativnoj i pozitivnoj kontroli potreban je kako bi se dokazalo da su studije provedene na primjeren način.
43. Ne može se utvrditi da je ispitivana kemikalija negativna ako se u pozitivnoj kontroli pravilno ne otkriju i mutanti koji tvore velike kolonije i oni koji tvore male kolonije. Opis kolonije može se upotrijebiti za davanje općih informacija o sposobnosti ispitivane kemikalije da uzrokuje točkaste mutacije i/ili kromosomske pojave (stavak 4.).
44. TK6: mutanti koji rastu normalno i oni koji rastu sporo razlikuju se prema različitim vremenima inkubacije (vidjeti stavak 40.) Kod testa TK6 mutanti koji se javljaju rano i oni koji se javljaju kasno obično se ocjenjuju za sve kulture, uključujući negativne i pozitivne kontrole. Opis kolonija negativne i pozitivne kontrole potreban je kako bi se dokazalo da su studije provedene na primjeren način. Ne može se utvrditi da je ispitivana kemikalija negativna ako se u pozitivnoj kontroli pravilno ne otkriju i mutanti koji se javljaju rano i mutanti koji se javljaju kasno. Opis kolonije može se upotrijebiti za davanje općih informacija o sposobnosti ispitivane kemikalije da uzrokuje točkaste mutacije i/ili kromosomske pojave (stavak 4.).

Osposobljenost laboratorija

45. Kako bi dokazao da ima dovoljno iskustva u izvođenju testa prije njegove rutinske primjene, laboratorij treba izvesti niz pokusa s referentnim pozitivnim tvarima koje djeluju putem različitih mehanizama (najmanje jedna aktivna s metaboličkom aktivacijom i jedna aktivna bez metaboličke aktivacije, odabrana s popisa tvari iz tablice 1.) te s različitim negativnim kontrolama (uključujući netretirane kulture i različita otapala/nosače). Odgovori pozitivnih i negativnih kontrola trebali bi biti u skladu s literaturom. Taj se zahtjev ne odnosi na laboratorije s iskustvom, odnosno laboratorije s bazom prijašnjih podataka koja je stavljena na raspolaganje u skladu s definicijom iz stavaka 47.–50. Kod testa MLA vrijednosti koje se dobiju i za pozitivne i za negativne kontrole trebaju biti u skladu s preporukama IWGT-a (vidjeti tablicu 2.).
46. Odabir tvari za pozitivnu kontrolu (vidjeti tablicu 1.) trebao bi se ispitati s kratkim i dugim tretiranjima (ako se upotrebljavaju duga tretiranja) u odsustvu metaboličke aktivacije i kratkim tretiranjima u prisustvu metaboličke aktivacije kako bi se dokazala osposobljenost za otkrivanje mutagenih kemikalija, za utvrđivanje djelotvornosti sustava metaboličke aktivacije i za dokazivanje primjerenosti uvjeta za rast stanica tijekom tretiranja, fenotipske ekspresije i selekcije mutanata te postupaka ocjenjivanja. Potrebno je izabrati raspon koncentracija odabranih tvari pri kojima će doći do ponovljivih povećanja u odnosu na pozadinu, koja su povezana s koncentracijom, kako bi se dokazala osjetljivost i dinamički raspon ispitnog sustava.

Podaci o prijašnjim kontrolama

47. Laboratorij bi trebao utvrditi:

- raspon i distribuciju prijašnjih pozitivnih kontrola,
- raspon i distribuciju prijašnjih negativnih kontrola (netretirane kulture, kontrole s otapalom).

48. Pri prvom bi dobivanju podataka za distribuciju podataka o prijašnjim negativnim kontrolama istodobne negativne kontrole trebale biti u skladu s objavljenim podacima o negativnim kontrolama. Kako se budu dodavali novi eksperimentalni podaci o distribuciji kontrola, istodobne negativne kontrole trebale bi u idealnom slučaju biti unutar kontrolnih granica od 95 % te distribucije (64. i 65.).
49. Baza podataka o prijašnjim negativnim kontrolama laboratorija trebala bi u početku obuhvaćati najmanje deset pokusa, međutim bilo bi poželjno da se sastoji od najmanje 20 pokusa provedenih u usporedivim pokusnim uvjetima. Laboratoriji bi trebali primjenjivati metode za kontrolu kvalitete, kao što su kontrolni dijagrami (npr. C-dijagrami ili X-stupčasti dijagrami; 65.), kako bi utvrdili koliko su promjenjivi njihovi podaci o pozitivnim i negativnim kontrolama i dokazali da je u njihovu laboratoriju metodologija „pod kontrolom” (66.). Daljnje pojedinosti i preporuke o tome kako izraditi i upotrebljavati prijašnje podatke mogu se pronaći u literaturi (64.).
50. Podaci o negativnim kontrolama trebali bi se sastojati od podataka o učestalosti pojave mutanata u jednoj kulturi ili, po mogućnosti, u ponovljenim kulturama kako je opisano u stavku 27. Istodobne negativne kontrole u idealnom bi slučaju trebale biti unutar kontrolnih granica od 95 % distribucije prijašnjih negativnih kontrola koje se nalaze u bazi podataka laboratorija. Ako se podaci o negativnim kontrolama nalaze izvan kontrolnih granica od 95 %, mogu biti prihvatljivi za uključenje u distribuciju prijašnjih kontrola pod uvjetom da ti podaci nisu ekstremne netipične vrijednosti te da postoje dokazi o tome da je ispitni sustav „pod kontrolom” (vidjeti stavak 49.) i da nema tehničke ili ljudske pogreške.
51. Svaku izmjenu pokusnog protokola trebalo bi razmotriti s obzirom na to jesu li podaci u skladu s postojećim bazama podataka laboratorija o prijašnjim kontrolama. Svaka veća nesukladnost trebala bi dovesti do uspostave nove baze podataka o prijašnjim kontrolama.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Predstavljanje rezultata

52. Predstavljanje podataka i za test MLA i za test TK6 treba uključivati, i za tretirane i kontrolne kulture, podatke potrebne za izračun citotoksičnosti (relativni ukupni rast ili relativna stopa preživljavanja) i učestalosti pojave mutanata, kako je opisano u nastavku.
53. Kod testa MLA treba navesti podatke o pojedinačnim kulturama za relativni rast u suspenziji, relativni ukupni rast, učinkovitost kloniranja u trenutku selekcije mutanata i broj kolonija mutanata (za verziju s agarom) ili broj praznih jažica (za verziju s mikrojažicama). Učestalost pojave mutanata treba izraziti kao broj mutiranih stanica na milijun preživjelih stanica. Ako je odgovor pozitivan, učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama (i/ili postotak ukupne učestalosti pojave mutanata) treba navesti za barem jednu koncentraciju ispitivane kemikalije (obično najviša pozitivna koncentracija) te negativne i pozitivne kontrole. U slučaju negativnog odgovora učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama treba navesti za negativnu i pozitivnu kontrolu.
54. Kod testa TK6 podatke o pojedinačnim kulturama treba navesti za relativnu stopu preživljavanja, učinkovitost kloniranja u trenutku selekcije mutanata i broj praznih jažica za mutante koji se javljaju rano i one koji se javljaju kasno. Učestalost pojave mutanata treba izraziti kao broj mutiranih stanica na broj preživjelih stanica, a treba uključivati ukupnu učestalost pojave mutanata te učestalost pojave mutanata (i/ili postotak ukupne učestalosti pojave mutanata) koji se javljaju rano i onih koji se javljaju kasno.

Kriteriji prihvatljivosti

55. I za test MLA i za test TK6 treba ispuniti sljedeće kriterije prije nego što se utvrde ukupni rezultati za određenu ispitivanu kemikaliju:
- provedena su dva pokusna uvjeta (kratko tretiranje s metaboličkom aktivacijom i bez nje – vidjeti stavak 33.), osim ako je jedan doveo do pozitivnih rezultata,
 - odgovarajući broj stanica i koncentracija prikladan je za analizu (stavci 27., 34.–36.),
 - kriteriji za odabir najveće koncentracije u skladu su s kriterijima opisanim u stavcima 28.–30.

Kriteriji prihvatljivosti za negativne i pozitivne kontrole

56. Analiza velike količine podataka iz testova MLA koju je provela IWGT-ova Stručna skupina za MLA dovela je do međunarodnog konsenzusa u pogledu specifičnih kriterija prihvatljivosti za test MLA (1., 2., 3., 4. i 5.). Stoga se u toj ispitnoj metodi navode specifične preporuke za utvrđivanje prihvatljivosti negativnih i pozitivnih kontrola te za procjenu rezultata pojedinačnih tvari u testu MLA. Baza podataka za test TK6 mnogo je manja te ga stručna skupina nije procjenjivala.
57. Kod testa MLA svaki pokus treba procijeniti s obzirom na to ispunjava li netretirana kontrola/kontrola s otapalom kriterije prihvatljivosti IWGT-ove Stručne skupine za MLA (4. i tablica 2. u nastavku) za: 1. učestalost pojave mutanata (treba napomenuti da se IWGT-ove prihvatljive učestalosti pojave mutanata razlikuju za verzije testa MLA s agarom i mikrojažicama); 2. učinkovitost kloniranja (CE) u trenutku selekcije mutanata i 3. rast u suspenziji (SG) za kontrolu s otapalom (formule potražiti u Dodatku 2.).

Tablica 2.

Kriteriji prihvatljivosti za MLA

Parametar	Metoda s mekim agarom	Metoda s mikrojažicama
Učestalost pojave mutanata	$35 - 140 \times 10^{-6}$	$50 - 170 \times 10^{-6}$
Učinkovitost kloniranja	65–120 %	65–120 %
Rast u suspenziji	8–32 puta (tretiranje od tri do četiri sata) 32–180 puta (tretiranje od 24 sata, ako se provodi)	8–32 puta (tretiranje od tri do četiri sata) 32–180 puta (tretiranje od 24 sata, ako se provodi)

58. Kad je riječ o testu MLA, svaki test treba procijeniti i u pogledu toga ispunjavaju li pozitivne kontrole barem jedan od sljedeća dva kriterija prihvatljivosti koje je razvila stručna skupina IWGT-a:

- pozitivna kontrola trebala bi pokazati apsolutno povećanje ukupne učestalosti pojave mutanata, tj. povećanje veće od pozadinske učestalosti pojave spontanijih mutanata (inducirana učestalost pojave mutanata (IMF)) od najmanje 300×10^{-6} . Najmanje 40 % IMF-a trebalo bi se odraziti u učestalosti pojave mutanata u maloj koloniji,
- pozitivna kontrola pokazuje povećanje učestalosti pojave mutanata u maloj koloniji koje je za najmanje 150×10^{-6} veće od učestalosti u istodobnoj netretiranoj kontroli/kontroli s otapalom (IMF u malim kolonijama od 150×10^{-6}).

59. Kad je riječ o testu TK6, test će biti prihvatljiv ako se istodobna negativna kontrola smatra prihvatljivom za dodavanje u bazu podataka laboratorija o prijašnjim negativnim kontrolama kako je opisano u stavcima 48.–49. Osim toga, istodobne pozitivne kontrole (vidjeti stavak 32.) trebale bi inducirati odgovore koji su u skladu s onima generiranim u bazi podataka o prijašnjim pozitivnim kontrolama te dovesti do statistički značajnog povećanja u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu.

60. Kod oba bi testa gornja granica citotoksičnosti uočene kod pozitivne kontrolne kulture trebala biti ista kao i kod pokusnih kultura. Drugim riječima, relativni ukupni rast ili relativna stopa preživljavanja ne bi trebali biti manji od 10 %. Dovoljno je upotrijebiti jednu koncentraciju (ili jednu od koncentracija pozitivnih kontrolnih kultura ako se upotrebljava više koncentracija) kako bi se dokazalo da su ispunjeni kriteriji prihvatljivosti za pozitivnu kontrolu. Nadalje, učestalost pojave mutanata pozitivne kontrole mora biti unutar prihvatljivog raspona utvrđenog za laboratorij.

Ocjnjivanje i tumačenje rezultata

61. Za test MLA znatan posao u vezi s biološkom relevantnosti i kriterijima za pozitivni odgovor obavila je IWGT-ova stručna skupina za limfome miša (4.). Stoga se u ovoj ispitnoj metodi pružaju specifične preporuke za tumačenje rezultata ispitivanih kemikalija iz testa MLA (vidjeti stavke 62.–64.). Baza podataka za test TK6 mnogo je manja te ga stručna skupina nije procjenjivala. Stoga su preporuke za tumačenje podataka za test TK6 općenitije (vidjeti stavke 65.–66.). Dodatne preporuke primjenjuju se na oba testa (vidjeti stavke 67.–71.).

MLA

62. Preporučuje se pristup za utvrđivanje pozitivnih i negativnih odgovora kako bi se osiguralo da je povećana učestalost pojave mutanata biološki relevantna. Umjesto statističke analize koja se obično upotrebljava za ostale testove, ovaj se pristup oslanja na upotrebu unaprijed utvrđene inducirane učestalosti pojave mutanata (tj. povećanje učestalosti pojave mutanata veće nego u istodobnoj kontroli), određene kao globalni evaluacijski faktor (GEF), koji se temelji na analizi distribucije podataka o učestalosti pojave mutanata u negativnoj kontroli iz uključenih laboratorija (4.). Kod verzije testa s agarom GEF iznosi 90×10^{-6} , a za verziju testa MLA s mikrožajicama GEF iznosi 126×10^{-6} .

63. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom ako je u bilo kojem ispitnom pokusnom uvjetu (vidjeti stavak 33.) povećanje učestalosti pojave mutanata u odnosu na istodobno provedeno pozadinsko mjerenje veće od GEF-a te je povezano s koncentracijom (npr. upotrebom testa trenda). Tada se smatra da ispitivana kemikalija može inducirati mutacije u tom ispitnom sustavu.

64. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno negativnom ako u svim ispitnim pokusnim uvjetima (vidjeti stavak 33.) nema odgovora povezanog s koncentracijom ili, ako postoji povećanje učestalosti pojave mutanata, ono nije veće od GEF-a. Tada se smatra da ispitivana kemikalija ne može inducirati mutacije u tom ispitnom sustavu.

TK6

65. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno pozitivnom ako je u bilo kojem od ispitanih pokusnih uvjeta (vidjeti stavak 33.):

- najmanje pri jednoj ispitnoj koncentraciji uočeno je statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,
- odgovarajući test trenda pokazuje da je povećanje povezano s koncentracijom (vidjeti stavak 33.),
- bilo koji od rezultata je izvan distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti stavak 48.).

Kada su ispunjeni svi ti uvjeti, smatra se da ispitivana kemikalija može inducirati mutacije u tom sustavu ispitivanja. Preporuke za najprikladnije statističke metode nalaze se u literaturi (66. i 67.).

66. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se jasno negativnom ako u svim ispitanim pokusnim uvjetima (vidjeti stavak 33.):

- ni pri jednoj ispitnoj koncentraciji nije uočeno statistički značajno povećanje u odnosu na istodobnu negativnu kontrolu,
- odgovarajući test trenda pokazuje da nema povećanja povezanog s koncentracijom,
- svi su rezultati u okviru distribucije podataka o prijašnjim negativnim kontrolama (npr. kontrolne granice od 95 % prema Poissonovoj distribuciji; vidjeti stavak 48.).

Tada se smatra da ispitivana kemikalija ne može inducirati mutacije u tom ispitnom sustavu.

I za test MLA i za test TK6:

67. Ako se najveća koncentracija temelji na citotoksičnosti, najvećom koncentracijom trebao bi se nastojati ostvariti RTG/RS od 20 do 10 %. Konsenzus je da treba oprezno tumačiti pozitivne rezultate koji se nalaze samo u rasponu RTG-a/RS-a od 20 do 10 % te da se rezultat neće smatrati pozitivnim ako je do povećanja učestalosti pojave mutanata došlo samo kod RTG-a/RS-a od 10 % ili manjeg (ako se procjenjuje) (2. i 59.).

68. Postoje određene okolnosti u kojima dodatne informacije mogu pomoći u utvrđivanju da ispitivana kemikalija nije mutagena ako nema kulture koja pokazuje vrijednost RTG-a od 10 do 20 % RTG-a/RS-a. Te su situacije sažete u nastavku teksta. 1. Ne postoje dokazi o mutagenom učinku (npr. nema odgovora na dozu, nema učestalosti pojave mutanata veće od one koja se opaža kod istodobne negativne kontrole ili u odnosu na prijašnje pozadinske raspone itd.) u nizu podatkovnih točaka od 100 % do 20 % RTG-a/RS-a te postoji barem jedna podatkovna točka u rasponu od 20 do 25 % RTG-a/RS-a. 2. Ne postoje dokazi o mutagenom učinku (npr. nema odgovora na dozu, nema učestalosti pojave mutanata veće od one koja se opaža kod istodobne negativne kontrole ili u odnosu na prijašnje pozadinske raspone itd.) u nizu podatkovnih točaka od 100 % do 25 % RTG-a/RS-a te postoji i negativna podatkovna točka koja je malo niža od 10 % RTG-a/RS-a. U te dvije situacije može se zaključiti da je ispitivana kemikalija negativna.

69. Jasno pozitivan ili negativan odgovor nije potrebno provjeravati.

70. Ako odgovor nije ni jasno pozitivan ni jasno negativan kako je prethodno opisano i/ili kako bi se pridonijelo utvrđivanju biološke relevantnosti rezultata, podatke bi trebalo ocjenjivati na temelju stručne prosudbe i/ili daljnjih istraživanja. Moglo bi biti korisno ponoviti pokus, eventualno u izmijenjenim pokusnim uvjetima (npr. razmak između koncentracija kako bi se povećala vjerojatnost dobivanja podatkovnih točaka u rasponu od 10 do 20 % RTG-a/RS-a, upotreba drugih uvjeta metaboličke aktivacije (tj. koncentracija S9 ili podrijetlo S9) i trajanje tretiranja).

71. U rijetkim slučajevima, čak i nakon dodatnih istraživanja, skup podataka neće omogućiti donošenje zaključka o tome je li rezultat pozitivan ili negativan. Stoga bi se trebalo zaključiti da je odgovor na ispitivanu kemikaliju dvosmislen (tumači se da je jednako vjerojatno da je pozitivan ili negativan).

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

72. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu, ako su poznate,
- izmjerene vrijednosti za pH, osmolalnost i taloženje u mediju za uzgoj kulture u koju je dodana ispitivana kemikalija, prema potrebi.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Otapalo:

- obrazloženje odabira otapala,
- postotak otapala u konačnom mediju za uzgoj kulture.

Stanice:

za laboratorijske glavne kulture:

- vrsta i izvor stanica te prethodna upotreba u ispitnom laboratoriju,
- kariotipna svojstva i/ili modalni broj kromosoma,
- metode održavanja staničnih kultura,
- odsustvo mikoplazme,
- vremena udvostručivanja stanica.

Ispitni uvjeti:

- obrazloženje odabira koncentracija i broja staničnih kultura, uključujući, npr. podatke o citotoksičnosti i ograničenja topljivosti,

- sastav medija, koncentracija CO₂, razina vlažnosti,
- koncentracija ispitivane kemikalije izražena kao konačna koncentracija u mediju za uzgoj kulture (npr. µg ili mg/ml ili mM medija za uzgoj kulture),
- koncentracija (i/ili volumen) otapala i ispitivane kemikalije koji su dodani mediju za uzgoj kulture,
- temperatura inkubacije,
- vrijeme inkubacije,
- trajanje tretiranja,
- gustoća stanica za vrijeme tretiranja,
- vrsta i sastav sustava metaboličke aktivacije (izvor S9, metoda pripreme mješavine S9, koncentracija ili volumen mješavine S9 i S9 u konačnom mediju za uzgoj kulture, kontrole kvalitete S9),
- tvari za pozitivnu i negativnu kontrolu, konačne koncentracije za svaki uvjet tretiranja,
- dužina razdoblja ekspresije (uključujući broj nasađenih stanica te režim uzgoja supkultura i dodavanja hranjivih tvari, ako je primjereno),
- identitet selektivnog agensa i njegova koncentracija,
- kod testa MLA treba navesti primijenjenu metodu (agar ili mikrojažice),
- kriteriji prihvatljivosti testova,
- metode korištene za prebrojavanje vijabilnih i mutiranih stanica,
- metode mjerenja citotoksičnosti,
- sve dodatne informacije koje se odnose na citotoksičnost i upotrijebljenu metodu,
- trajanje inkubacije nakon nasađivanja,
- definicija kolonija kod kojih se razmatra veličina i vrsta (uključujući kriterije za „male” i „velike” kolonije, ako je primjereno),
- kriteriji prema kojima se studija smatra pozitivnom, negativnom ili dvosmislenom,
- metode upotrijebljene za određivanje pH-vrijednosti i osmolalnosti, ako se provode, te za određivanje taloženja, ako je relevantno.

Rezultati:

- broj tretiranih stanica i broj supkultiviranih stanica za svaku kulturu,
- parametri toksičnosti (RTG za MLA i RS za TK6),
- znakovi taloženja i vrijeme utvrđivanja,
- broj stanica nasađenih u selektivni i neselektivni medij,

- broj kolonija u neselektivnom mediju i broj otpornih kolonija u selektivnom mediju te povezana učestalost pojave mutanata,
- razvrstavanje kolonija po veličini za negativne i pozitivne kontrole, a ako je ispitivana kemikalija pozitivna, najmanje jedna koncentracija i povezane učestalosti pojave mutanata,
- odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,
- podaci o istodobnim negativnim kontrolama (otapalo) i pozitivnim kontrolama (koncentracije i otapala),
- podaci o prijašnjim negativnim (otapalo) i pozitivnim kontrolama (koncentracije i otapala) s rasponima, srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama, broj ispitivanja na kojima se temelje kontrole iz prijašnjih ispitivanja,
- statističke analize (za pojedinačne kulture i objedinjena ponavljanja ako je primjereno) i p-vrijednosti, ako postoje, te procjena GEF-a za test MLA.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

1. Moore, M.M., Honma, M., Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185.–190.
2. Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (travanj 2000.), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292.–299.
3. Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127.–140.
4. Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1.–5.
5. Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36.–40.
6. OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Pariz.

7. Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. *Mutation Res.*, 746 (1): 21.–28.
8. Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. *Mutation Res.*, 493 (1-2): 101.–114.
9. Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol. Sci.*, 109 (1): 96.–105.
10. Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. National. Academy. Sci. SAD*, 87 (1): 51.–55.
11. Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK^{+/–} Leads to TK^{–/–} Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, *Mutation Res.*, 84 (1): 169.–181.
12. Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK^{–/–} Mutants Early in their Clonal History, *Mutation Res.*, 147 (5): 237.–242.
13. Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK^{+/–} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): 161.–174.
14. Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 178 (1): 143.–153.
15. Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18 (1): 77.–87.
16. Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation. Res.*, 374 (1): 89.–98.
17. Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinogen.*, 28 (4): 203.–14.
18. Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. *Mutation Res.*, 267 (1): 89.–95.
19. Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK^{+/–} –3.7.2C) Forward Mutation Assay. In *Protocols in Genotoxicity Assessment* A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27.–50.
20. Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634 (1-2): 177.–183.
21. Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): 439.–452.
22. Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. *Environ. Mutagen.*, 8 (6): 879.–886.

23. Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268 (2): 297.–305.
24. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257: 147.–204.
25. Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. *Mutation Res.*, 626 (1-2): 185.–190.
26. Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 76: 673.–680.
27. Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK^{+/−} Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutation Res.*, 59(1): 61.–108.
28. Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/−} 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 147 (5): 243.–253.
29. Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/−} Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): 181.–193.
30. Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK^{+/−}–3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (2): 127.–131.
31. Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y TK^{+/−} Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 55 (1): 35.–42.
32. Storer, R.D., Jaynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y TK^{+/−} Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. *Mutation. Res.*, 373 (2): 157.–165.
33. Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mutagen.*, 19 (4): 263.–268.
34. Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84 (2): 411.–416.
35. Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45 (2-3): 162.–176.
36. Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. *Cancer. Res.*, 55 (1): 12.–15.
37. Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Rukopis u pripremi).

38. Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.
39. Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. U: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell (Eds), 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ).
40. Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid human Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94 (2): 467.–485.
41. Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O.W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *ATLA*, 33 (3): 261.–287.
42. Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK⁺ Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, *Mutation Res.*, 104 (4-5): 287.–294.
43. Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31 (6): 347.–364.
44. Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113 (3-4): 173.–215.
45. Natarajan, A.T., Bates, A.D., Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37 (1): 83.–90.
46. Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66 (3): 277.–290.
47. Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55.–65.
48. Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.*, 7 (3): 175.–177.
49. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. U: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, str. 85.–88.
50. Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312 (3): 241.–261.
51. Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28 (1): 51.–59.
52. UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

53. Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. U: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L. and Schaich K.M. (Eds.) New York, Plenum, str. 91.–103.
54. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795.–801.
55. Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122.–130.
56. Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. U: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, str. 66.–101.
57. Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32.–56.
58. Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36.–43.
59. USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Dostupno na: [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
60. Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373.–384.
61. Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK^{-/-}) Mutants from L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363.–378.
62. Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9.–17.
63. Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1.–8.
64. Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87.–90.
65. Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.
66. OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 199), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
67. Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Aneugen: svaka kemikalija ili postupak koji u interakciji s elementima mitotičkog i mejotičkog ciklusa diobe stanice uzrokuje aneuploidiju u stanicama ili organizmima.

Aneuploidija: svako odstupanje od uobičajenog diploidnog (ili haploidnog) broja kromosoma za jedan kromosom ili više njih, ali ne za cijelu skupinu ili skupine kromosoma (poliploidija).

Mutageni supstitucije baznih parova: kemikalije koje uzrokuju supstituciju baznih parova u DNK-u.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Učinkovitost kloniranja: postotak stanica nasađenih pri malenoj gustoći koje mogu narasti u koloniju koja se može prebrojiti.

Klastogen: svaka kemikalija ili proces koji uzrokuju strukturne kromosomske aberacije u populacijama stanica ili organizama.

Citotoksičnost: za testove obuhvaćene ovom ispitnom metodom citotoksičnost se definira kao smanjenje relativnog ukupnog rasta (RTG) za MLA ili relativne stope preživljavanja (RS) za TK6.

Napredna mutacija: genska mutacija od roditeljskog tipa u mutantni oblik, koja uzrokuje promjenu ili gubitak enzimskog djelovanja ili funkcije kodiranog proteina.

Mutageni pomaka okvira očitavanja (frameshift mutageni): kemikalije koje uzrokuju adiciju ili deleciju jednog baznog para ili više njih u molekuli DNK.

Genotoksičnost: opći izraz kojim su obuhvaćene sve vrste oštećenja DNK ili kromosoma uključujući lomove DNK, adukte, premještanja, mutacije, aberacije kromosoma i aneuploidiju. Ne dovode sve vrste genotoksičnih učinaka do mutacija ili trajnog oštećenja kromosoma.

Mitotska rekombinacija: rekombinacija između homolognih kromatida koja može dovesti do indukcije lomova oba lanca DNK ili gubitka heterozigotnosti, a do koje dolazi tijekom mitoze.

Mutagen: uzrokuje nasljednu promjenu slijeda (sljedova) parova baza DNK u genima ili strukture kromosoma (kromosomske aberacije).

Učestalost pojave mutanata (MF): broj uočenih mutiranih stanica podijeljen brojem vijabilnih stanica.

Vrijeme fenotipske ekspresije: vrijeme nakon tretiranja tijekom kojeg se genetske modifikacije fiksiraju unutar genoma i postojeći genski produkti odstranjuju do te mjere da se mijenja fenotipsko svojstvo.

Relativna stopa preživljavanja (RS): relativna stopa preživljavanja upotrebljava se kao mjera citotoksičnosti povezane s tretiranjem u testu TK6. To je relativna učinkovitost kloniranja (CE) stanica koje se nasade odmah nakon što ih se tretira, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja u odnosu na učinkovitost kloniranja negativne kontrole.

Relativni rast u suspenziji (RSG): kod testa MLA, relativni ukupni rast ispitivane kulture u suspenziji tijekom dva dana u usporedbi s ukupnim rastom negativne kontrole/kontrole s otapalom u suspenziji tijekom dva dana (Clive i Spector, 1975.). Relativni rast u suspenziji treba uključivati relativni rast ispitivane kulture u usporedbi s negativnom kontrolom/kontrolom s otapalom tijekom razdoblja tretiranja.

Relativni ukupni rast (RTG): relativni ukupni rast upotrebljava se kao mjera citotoksičnosti povezane s tretiranjem u testu MLA. To je mjera relativnog (u odnosu na kontrolu s nosačem) rasta ispitivanih kultura tijekom faza tretiranja, dvodnevne ekspresije i kloniranja selekcije mutanata u testu. Relativni ukupni rast svake ispitivane kulture množi se relativnom učinkovitošću kloniranja ispitivane kulture u trenutku selekcije mutanata i izražava se u odnosu na učinkovitost kloniranja negativne kontrole/kontrole s otapalom (Clive i Spector, 1975.).

Frakcije jetre S9: supernatant homogenata jetre centrifugiran na 9 000 g, tj. ekstrakt sirove jetre.

Mješavina S9: mješavina frakcije jetre S9 i kofaktora potrebnih za djelovanje metaboličkih enzima.

Rast u suspenziji (SG): multiplikacijski faktor povećanja broja stanica tijekom faza tretiranja i ekspresije testa MLA. Kod kratkog tretiranja (tri ili četiri sata) rast u suspenziji računa se tako da se multiplikacijski faktor povećanja prvog dana pomnoži s multiplikacijskim faktorom povećanja drugog dana. Ako se upotrebljava 24-satno tretiranje, rast u suspenziji računa se tako da se multiplikacijski faktor povećanja tijekom 24-satnog tretiranja pomnoži multiplikacijskim faktorima povećanja prvog i drugog dana.

Kontrola s otapalom: opći izraz za označivanje kontrolnih kultura kojima je dodano jedino otapalo koje je upotrijebljeno za otapanje ispitivane kemikalije.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Netretirane kontrole: netretirane kontrole kulture su koje nisu ni s čim tretirane (tj. ni ispitivanom kemikalijom ni otapalom), ali se obrađuju na isti način kao kulture tretirane ispitivanom kemikalijom.

Dodatak 2.

FORMULE

Citotoksičnost

Za obje verzije testa MLA (s agarom i mikrojažicama)

Citotoksičnost se definira kao relativni ukupni rast (RTG), što uključuje relativni rast u suspenziji (RSG) tijekom dvodnevnog razdoblja ekspresije i relativnu učinkovitost kloniranja (RCE) dobivenu u trenutku selekcije mutanata. RTG, RSG i RCE izražavaju se kao postotak.

Izračun RSG-a: rast u suspenziji jedan (SG_1) stopa je rasta od nultog do prvog dana (koncentracija stanica prvog dana/koncentracija stanica nultog dana), a rast u suspenziji dva (SG_2) stopa je rasta od prvog do drugog dana (koncentracija stanica drugog dana/koncentracija stanica prvog dana). RSG je ukupni SG ($SG_1 \times SG_2$) za tretiranu kulturu u usporedbi s netretiranom kontrolom/kontrolom s otapalom. To jest: $RSG = [SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(kontrola)} \times SG_{2(kontrola)}]$. SG_1 treba izračunati iz početne koncentracije stanica koja je upotrijebljena na početku tretiranja stanica. Time se uzima u obzir bilo kakva diferencijalna citotoksičnost do koje dolazi u ispitivanim kulturama tijekom tretiranja stanica.

RCE je relativna učinkovitost kloniranja ispitivane kulture u usporedbi s relativnom učinkovitošću kloniranja netretirane kontrole/kontrole s otapalom dobivena u trenutku selekcije mutanata.

Relativni ukupni rast (RTG): $RTG = RSG \times RCE$

TK6

Relativna stopa preživljavanja (RS):

Citotoksičnost se procjenjuje relativnom stopom preživljavanja, tj. učinkovitošću kloniranja stanica koje se nasade odmah nakon tretiranja, prilagođeno za mogući gubitak stanica tijekom tretiranja u odnosu na učinkovitost kloniranja u negativnim kontrolama (kojima se dodjeljuje stopa preživljavanja od 100 %). Prilagodba za gubitak stanica tijekom tretiranja može se izračunati na sljedeći način:

$$\text{Prilagođeni CE} = \text{CE} \times \frac{\text{Broj stanica na kraju tretiranja}}{\text{Broj stanica na početku tretiranja}}$$

Relativna stopa preživljavanja za kulturu tretiranu ispitivanom kemikalijom računa se na sljedeći način:

$$RS = \frac{\text{Prilagođeni CE u tretiranoj kulturi}}{\text{Prilagođeni CE u kontroli s otapalom}} \times 100$$

Učestalost pojave mutanata za testove MLA i TK6

Učestalost pojave mutanata (MF) učinkovitost je kloniranja kolonija mutanata u selektivnom mediju (CE_M), prilagođeno s obzirom na učinkovitost kloniranja u neselektivnom mediju u trenutku selekcije mutanata (CE_V). Drugim riječima, $MF = CE_M/CE_V$. Izračun tih dviju učinkovitosti kloniranja za metode kloniranja s agarom i mikrojažicama opisan je u nastavku.

Verzija testa MLA s agarom: u verziji testa MLA s mekim agarom broj kolonija na ploči za selekciju mutanata (C_M) i broj kolonija na neprobranoj ploči ili ploči za učinkovitost kloniranja (broj vijabilnih stanica) (C_V) dobiva se izravnim brojanjem klonova. Ako se 600 stanica nasadi na ploče za selekciju mutanata (CE_M) za učinkovitost kloniranja (CE) te na neprobrane ploče ili ploče za učinkovitost kloniranja (broj vijabilnih stanica) (CE_V) te se za selekciju mutanata upotrijebi 3×10^6 stanica,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

Verzija testova MLA i TK6 s mikrojažicama: u verziji testa MLA C_M i C_V utvrđuju se kao umnožak ukupnog broja mikrojažica (TW) i vjerojatnog broja kolonija po jažici (P) na pločama s mikrojažicama.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Od nulte točke Poissonove distribucije (Furth et al., 1981.) P se određuje kao

$$P = -\ln (EW / TW)$$

Pri tom EW označava prazne jažice, a TW ukupne jažice. Zato je

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Kod verzije testa MLA s mikrojažicama učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama računat će se na isti način, upotrebom odgovarajućeg broja praznih jažica za male i velike kolonije.

Kod testa TK6 učestalost pojave mutanata u malim i velikim kolonijama temelji se na mutantima koji se javljaju rano i onima koji se javljaju kasno.

B.68. IN VITRO ISPITNA METODA S KRATKIM VREMENOM IZLAGANJA ZA UTVRĐIVANJE: i. KEMIKALIJA KOJE INDUCIRAJU TEŠKU OZLJEDU OKA I ii. KEMIKALIJA KOJE NIJE POTREBNO RAZVRSTATI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU OZLJEDU OKA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 491 (2017.). *In vitro* ispitna metoda s kratkim vremenom izlaganja (STE) jest *in vitro* metoda koja se može upotrebljavati u određenim okolnostima i uz specifična ograničenja za razvrstavanje i označivanje kemikalija (tvari i smjese) koje induciraju tešku ozljedu oka s obzirom na opasnosti te onih za koje nije potrebno razvrstavanje s obzirom na tešku ozljedu oka ili nadraživanje oka, kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označivanja kemikalija (GHS) Ujedinjenih naroda (UN) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) Europske unije ⁽¹⁾.
2. Dulji niz godina potencijal opasnosti kemikalija za oko ocjenjivao se prvenstveno upotrebom *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5. (8.), ekvivalentna Smjernici OECD-a za ispitivanje 405). Opće je prihvaćena činjenica da se u doglednoj budućnosti *in vivo* ispitivanje na oku kunića neće moći potpuno zamijeniti nijednim alternativnim pojedinačnim *in vitro* ispitivanjem za predviđanje različitih kemijskih razreda u punom rasponu teških ozljeda oka/nadraživanja oka. Međutim, kao potpuna zamjena za ispitivanje na oku kunića mogle bi se primjenjivati strateške kombinacije alternativnih ispitnih metoda u okviru strategije (višerazinskog) ispitivanja (2.). Pristup odozgo prema dolje osmišljen je za ispitivanje kemikalija za koje se na temelju postojećih informacija može očekivati da imaju veliki potencijal za nadražujuće djelovanje ili da induciraju teške ozljede oka. Nasuprot tome, pristup odozdo prema gore osmišljen je za ispitivanje kemikalija za koje se na temelju postojećih informacija može očekivati da ne izazivaju dovoljno nadraživanje oka da bi ih se moralo razvrstati. Iako se ispitna metoda STE ne smatra potpunom zamjenom za *in vivo* ispitivanje na oku kunića, primjerena je za upotrebu kao dio strategije višerazinskog ispitivanja za regulatorno razvrstavanje i označivanje, kao što je pristup odozgo prema dolje/odozdo prema gore, kako bi se bez daljnjeg ispitivanja utvrdile: i. kemikalije koje induciraju tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a) i ii. kemikalije (pri čemu se isključuju vrlo hlapljive tvari i sve kemikalije u krutom stanju osim površinski aktivnih tvari) koje nije potrebno razvrstati u pogledu nadraživanja ili teške ozljede oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u) (1. i 2.). Međutim, kemikalija za koju se ispitnom metodom STE ne predviđa ni da inducira tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a) ni da je bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u (ne inducira ni teške ozljede oka ni nadraživanje oka) morala bi se dodatno ispitati kako bi se utvrdilo konačno razvrstavanje. Nadalje, prije primjene ispitne metode STE u okviru pristupa odozdo prema gore u skladu s drugim shemama razvrstavanja osim sustava UN GHS/CLP-a trebalo bi se savjetovati s odgovarajućim regulatornim tijelima. Odabir najprimjerenije ispitne metode i upotrebu te ispitne metode treba razmotriti u kontekstu Smjernica OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni za teške ozljede oka i nadraživanje oka (14.).
3. Svrha je ove ispitne metode opisati postupke koji se primjenjuju za ocjenjivanje potencijala opasnosti ispitivane kemikalije za oko na temelju njezine sposobnosti induciranja citotoksičnosti u ispitnoj metodi s kratkim vremenom izlaganja. Citotoksični učinak kemikalija na epitelne stanice rožnice važan je način djelovanja (MOA) koji dovodi do oštećenja epitela rožnice i nadraživanja oka. Vijabilnost stanica u ispitnoj metodi STE procjenjuje se kvantitativnim mjerenjem nakon što se iz stanica ekstrahira sol plavog formazana koju proizvode žive stanice enzimskom konverzijom vitalne boje MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), poznate i kao tiazolil plavo tetrazolijev bromid (3.). Dobivena vijabilnost stanica uspoređuje se s kontrolom s otapalom (relativna vijabilnost) i upotrebljava za procjenu potencijala opasnosti ispitivane kemikalije za oko. Ispitivana kemikalija razvrstava se u kategoriju 1. sustava UN GHS-a/CLP-a ako i koncentracija od 5 % i 0,05 % rezultiraju vijabilnošću stanica od 70 % ili manjom (≤). Nasuprot tome, predviđa se da je kemikalija bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u ako i koncentracija od 5 % i 0,05 % rezultiraju vijabilnošću stanica većom od (>) 70 %.
4. U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana kemikalija” upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje te se ne odnosi na primjenjivost ispitne metode STE za ispitivanje tvari i/ili smjesa. Definicije su navedene u Dodatku.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

5. Ova se ispitna metoda temelji na protokolu koji je razvilo društvo Kao Corporation (4.) i koji je bio predmet dviju različitih validacijskih studija: jednu je proveo Validacijski odbor JSAE-a (Japansko društvo za alternative pokusima

⁽¹⁾ Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006, SL L 353/1, 31.12.2008.

na životinjama) (5.), a drugu JaCVAM (Japanski centar za validaciju alternativnih metoda) (6.). Stručnu reviziju proveo je NICEATM/ICCVAM na temelju izvješća validacijskih studija i osnovnih dokumenata za preispitivanje o ispitnoj metodi (7.).

6. Kada su se upotrijebili za utvrđivanje kemikalija (tvari i smjesa) koje induciraju teške ozljede oka (kategorija 1. prema sustavu UN GHS/CLP-u (1.)), podaci dobiveni upotrebom ispitne metode STE na 125 kemikalija (koje uključuju i tvari i smjese) pokazali su ukupnu točnost od 83 % (104/125), udio lažno pozitivnih rezultata od 1 % (1/86) i udio lažno negativnih rezultata od 51 % (20/39) u usporedbi s *in vivo* ispitivanjem na oku kunića (7.). Dobiveni udio lažno negativnih rezultata nije presudan u ovom kontekstu jer bi se sve ispitivane kemikalije koje induciraju vijabilnost stanica ≤ 70 % pri koncentraciji od 5 % i > 70 % pri koncentraciji od 0,05 % kasnije ispitale drugim primjereno validiranim *in vitro* ispitnim metodama ili, kao posljednja opcija, *in vivo* ispitivanjem na oku kunića, ovisno o regulatornim zahtjevima i u skladu sa strategijom sekvencijskog ispitivanja i pristupima snage dokaza koji se sada preporučuju (1. i 8.). Uglavnom su ispitane tvari s jednim sastojkom, iako postoji ograničena količina podataka i o ispitivanju smjesa. Unatoč tomu ova je ispitna metoda tehnički primjenjiva i za ispitivanje tvari s više sastojaka i smjesa. Međutim, prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Kod ispitne metode STE nisu uočeni nikakvi drugi specifični nedostaci kada se upotrebljava za utvrđivanje ispitivanih kemikalija kao kemikalija iz kategorije 1. sustava UN GHS/CLP-a. Istraživači bi mogli razmotriti primjenu ove ispitne metode na ispitivanim kemikalijama, pri čemu bi vijabilnost stanica ≤ 70 % pri koncentracijama od 5 % i 0,05 % trebalo prihvatiti kao pokazatelj odgovora da kemikalija inducira tešku ozljedu oka i da bi je bez daljnjeg ispitivanja trebalo razvrstati u kategoriju 1. sustava UN GHS/CLP-a.
7. Kada su se upotrijebili za utvrđivanje kemikalija (tvari i smjesa) koje nije potrebno razvrstati u pogledu nadraživanja i teške ozljede oka (tj. bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u), podaci dobiveni upotrebom ispitne metode STE na 130 kemikalija (koje uključuju i tvari i smjese) pokazali su ukupnu točnost od 85 % (110/130), udio lažno pozitivnih rezultata od 12 % (9/73) i udio lažno negativnih rezultata od 19 % (11/57) u usporedbi s *in vivo* ispitivanjem na oku kunića (7.). Ako se iz skupa podataka isključe vrlo hlapljive tvari i krute tvari osim površinski aktivnih tvari, ukupna točnost poboljšava se na 90 % (92/102), udio lažno negativnih rezultata na 2 % (1/54), a udio lažno pozitivnih rezultata na 19 % (9/48) (7.). Kao posljedica, potencijalni nedostaci ispitne metode STE, kada se upotrebljava za utvrđivanje ispitivanih kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje u pogledu nadraživanja i teških ozljeda oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u), uključuju visok udio lažno negativnih rezultata za: i. vrlo hlapljive tvari s tlakom pare većim od 6 kPa i ii. kemikalije u krutom stanju (tvari i smjese) osim površinski aktivnih tvari i smjesa koje se sastoje samo od površinski aktivnih tvari. Te kemikalije isključene su iz područja primjene ispitne metode STE (7.).
8. Uz kemikalije navedene u stavcima 6. i 7., skup podataka dobiven ispitnom metodom STE sadržava i interne podatke o 40 smjesa, koji su nakon što ih se usporedilo s *in vivo* Draizeovim ispitivanjem na oku pokazali točnost od 88 % (35/40), udio lažno pozitivnih rezultata od 50 % (5/10) i udio lažno negativnih rezultata od 0 % (0/30) u pogledu smjesa za koje nije potrebno razvrstavanje na temelju sustava razvrstavanja UN GHS/CLP-a (9.). Ispitna metoda STE stoga se može primjenjivati za utvrđivanje smjesa bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u u pristupu odozdo prema gore, uz iznimku smjesa u krutom stanju osim onih koje se sastoje samo od površinski aktivnih tvari, kao proširenje njezina ograničenja na tvari u krutom stanju. Nadalje, smjese koje sadržavaju tvari s tlakom pare većim od 6 kPa treba oprezno ocijeniti kako bi se izbjegla moguća preblaga predviđanja i treba ih ocijeniti na pojedinačnoj osnovi.
9. Ispitna metoda STE ne može se upotrebljavati za utvrđivanje ispitivanih kemikalija kao kemikalija iz kategorije 2. prema sustavu UN GHS/CLP-u ili kategorije 2.A (nadraživanje oka) ili 2.B (blago nadraživanje oka) prema sustavu UN GHS zbog znatnog broja kemikalija iz kategorije 1. prema GHS-u UN-a koje se preblago predviđaju kao kemikalije iz kategorije 2., 2.A ili 2.B te kemikalija bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u koje se prestrogo predviđaju kao kemikalije iz kategorije 2., 2.A ili 2.B (7.). U tu svrhu može biti potrebno daljnje ispitivanje drugom prikladnom metodom.

10. Ispitna metoda STE primjerena je za ispitivanje kemikalije koje se otapaju ili ravnomjerno suspendiraju najmanje pet minuta u fiziološkoj otopini, 5-postotnom dimetilsulfoksidu (DMSO) u fiziološkoj otopini ili u mineralnom ulju. Ispitna metoda STE nije primjerena za ispitivanje kemikalije koje nisu topljive ili se ne mogu ravnomjerno suspendirati najmanje pet minuta u fiziološkoj otopini, 5-postotnom dimetilsulfoksidu (DMSO) u fiziološkoj otopini ili u mineralnom ulju. Upotreba mineralnog ulja u ispitnoj metodi STE moguća je zbog kratkotrajnog izlaganja. Stoga je ispitna metoda STE primjerena za predviđanje potencijala opasnosti ispitivanih kemikalija netopivih u vodi za oko (npr. dugolančani masni alkoholi ili ketoni) pod uvjetom da se mogu miješati u najmanje jednom od tri prethodno predložena otapala (4).
11. U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana kemikalija” upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje ⁽¹⁾ te se ne odnosi na primjenjivost ispitne metode STE za ispitivanje tvari i/ili smjesa.

NAČELO ISPITIVANJA

12. Ispitna metoda STE *in vitro* je test koji se temelji na citotoksičnosti, a provodi se na konfluentnom monosloju stanica rožnice kunića Statens Serum Instituta (SIRC), koje se uzgajaju na polikarbonatnoj mikroploči s 96 jažica (4.). Nakon petominutnog izlaganja ispitivanoj kemikaliji citotoksičnost se kvantitativno mjeri kao relativna vijabilnost stanica SIRC upotrebom MTT testa (4.). Smanjena vijabilnost stanica upotrebljava se za predviđanje potencijalnih štetnih učinaka koji dovode do oštećenja oka.
13. Navedeno je da se 80 % otopine koja se nakapa u oko kunića izluči preko konjunktivalne vrećice u roku od tri do četiri minute, dok se više od 80 % otopine koja se nakapa u ljudsko oko izluči u roku od jedne do dvije minute (10.). Ispitnom metodom STE pokušavaju se uskladiti ta vremena izlaganja te se citotoksičnost upotrebljava kao krajnja točka za procjenu razmjera oštećenja stanica SIRC nakon petominutnog izlaganja ispitivanoj kemikaliji.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

14. Prije rutinske upotrebe ispitne metode STE opisane u ovoj ispitnoj metodi laboratoriji bi trebali dokazati tehničku osposobljenost točnim utvrđivanjem kategorije jedanaest tvari koje su preporučene u tablici 1. Te su tvari odabrane kako bi predstavljale cijeli raspon odgovora za ozbiljnu ozljedu oka ili nadraživanje oka na temelju rezultata *in vivo* ispitivanja na oku kunića (Smjernica za ispitivanje 405) i sustava razvrstavanja UN GHS/CLP-a (1.). Među ostalim su kriterijima za odabir: tvari bi trebale biti komercijalno dostupne, trebali bi biti dostupni visokokvalitetni *in vivo* referentni podaci i trebali bi biti dostupni visokokvalitetni *in vitro* podaci iz ispitne metode STE (3.). U slučajevima u kojima nije dostupna navedena tvar ili ako je to opravdano može se upotrijebiti druga tvar za koju su dostupni primjereni referentni *in vivo* i *in vitro* podaci pod uvjetom da se primjenjuju isti kriteriji kao ovdje opisani kriteriji.

Tablica 1.

Popis tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti

Tvar	CAS br.	Kemijski razred ⁽¹⁾	Agregatno stanje	<i>In vivo</i> kat. sustava UN GHS ili CLP-a ⁽²⁾	Otapalo u testu STE	STE kat. sustava UN GHS ili CLP-a
Benzalkonijev klorid (10 %, vodena otopina)	8001-54-5	Onijev spoj	Tekuće	Kategorija 1.	Fiziološka otopina	Kategorija 1.

⁽¹⁾ U lipnju 2013. na zajedničkom sastanku dogovoreno je da bi u novim i ažuriranim ispitnim metodama sada trebalo dosljednije upotrebljavati termin „ispitivana kemikalija” kojim se opisuje ono što se ispituje kada je to moguće.

Tvar	CAS br.	Kemijski razred ⁽¹⁾	Agregatno stanje	In vivo kat. sustava UN GHS ili CLP-a ⁽²⁾	Otapalo u testu STE	STE kat. sustava UN GHS ili CLP-a
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eter	Tekuće	Kategorija 1.	Fiziološka otopina	Kategorija 1.
Kiselo crvena 92	18472-87-2	Heterociklički spoj; spoj broma; spoj klora	Kruto	Kategorija 1.	Fiziološka otopina	Kategorija 1.
Natrijev hidroksid	1310-73-2	Lužina; anorganska kemikalija	Kruto	Kategorija 1. ⁽³⁾	Fiziološka otopina	Kategorija 1.
Butirolakton	96-48-0	Lakton; heterociklički spoj	Tekuće	Kategorija 2.A (kategorija 2. prema CLP-u)	Fiziološka otopina	Predviđanje nije moguće
1-oktanol	111-87-5	Alkohol	Tekuće	Kategorija 2.A/B ⁽⁴⁾ (kategorija 2. prema CLP-u)	Mineralno ulje	Predviđanje nije moguće
Ciklopentanol	96-41-3	Alkohol; ugljikovodik, ciklički	Tekuće	Kategorija 2.A/B ⁽⁵⁾ (kategorija 2. prema CLP-u)	Fiziološka otopina	Predviđanje nije moguće
2-etoksietilacetat	111-15-9	Alkohol; eter	Tekuće	Bez kategorije	Fiziološka otopina	Bez kategorije
Dodekan	112-40-3	Ugljikovodik, aciklički	Tekuće	Bez kategorije	Mineralno ulje	Bez kategorije
Metil-izobutil-keton	108-10-1	Keton	Tekuće	Bez kategorije	Mineralno ulje	Bez kategorije

Tvar	CAS br.	Kemijski razred ⁽¹⁾	Agregatno stanje	<i>In vivo</i> kat. sustava UN GHS ili CLP-a ⁽²⁾	Otapalo u testu STE	STE kat. sustava UN GHS ili CLP-a
1,1-dimetilgvanidin sulfat	598-65-2	Amidin; spoj sumpora	Kruto	Bez kategorije	Fiziološka otopina	Bez kategorije

⁽¹⁾ Kemijski razredi dodijeljeni su upotrebom informacija iz prethodnih publikacija NICEATM-a, a ako one nisu dostupne, upotrebom oznaka medicinskog nazivlja američke Nacionalne medicinske knjižnice (MeSH®) (putem baze podataka ChemID-plus® (Nacionalna medicinska knjižnica), dostupno na <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) i NICEATM-ovih određenja strukture.

⁽²⁾ Na temelju rezultata *in vivo* ispitivanja na oku kunića (Smjernica OECD-a za ispitivanje 405) i uz primjenu sustava UN GHS/CLP-a (1.).

⁽³⁾ Razvrstavanje u kategoriju 1. temelji se na potencijalu 100-postotnog natrijeva hidroksida da nagrize kožu (naveden kao kemikalija za dokazivanje osposobljenosti s potencijalom nagrizanja kože u Smjernici OECD-a za ispitivanje 435) i kriteriju za kategoriju 1. sustava UN GHS/CLP-a (1.).

⁽⁴⁾ Razvrstavanje u kategoriju 2.A ili 2.B ovisi o tumačenju kriterija sustava UN GHS za razlikovanje tih dviju kategorija, odnosno je li za razvrstavanje u kategoriju 2.A potrebno da dvije od šest životinja ili četiri od šest životinja imaju učinke sedmog dana. *In vivo* skup podataka uključivao je dvije studije s tri životinje u svakoj. U jednoj studiji dvije od tri životinje sedmog su dana pokazale učinke koji zahtijevaju razvrstavanje u kategoriju 2.A (11.), dok su u drugoj studiji sve krajnje točke kod sve tri životinje ponovno imale vrijednost nula do sedmog dana, što zahtijeva razvrstavanje u kategoriju 2.B (12.).

⁽⁵⁾ Razvrstavanje u kategoriju 2.A ili 2.B ovisi o tumačenju kriterija sustava UN GHS za razlikovanje tih dviju kategorija, odnosno je li za razvrstavanje u kategoriju 2.A potrebno da jedna od tri životinje ili dvije od tri životinje imaju učinke sedmog dana. *In vivo* istraživanje uključivalo je tri životinje. Osim zamućenja rožnice i crvenila konjunktive kod jedne životinje sve su krajnje točke ponovno imale vrijednost nula do sedmog dana ili ranije. Jedna životinja koja se nije potpuno oporavila do sedmog dana imala je vrijednost zamućenja rožnice 1 i crvenila konjunktive 1 (sedmog dana), a potpuno se oporavila 14. dana (11.).

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima

POSTUPAK

Priprema staničnog monosloja

15. Za provođenje ispitne metode STE treba upotrebljavati SIRC, staničnu liniju rožnice kunića. Preporučuje se da se stanice SIRC nabave iz kompetentne banke stanica kao što je American Type Culture Collection CCL60.
16. Stanice SIRC uzgajaju se na 37 °C s 5 % CO₂ i u vlažnim atmosferskim uvjetima u tikvici s kulturom koja sadržava medij za uzgoj kulture koji se sastoji od Eagleova minimalnog esencijalnog medija (MEM) obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS), 2 mM L-glutamina, 50–100 jedinica/ml penicilina i 50–100 µg/ml streptomicina. Stanice koje su postale konfluentne u tikvici s kulturom treba izdvojiti upotrebom otopine tripsin etilendiamintetraoctene kiseline, uz upotrebu pribora za struganje stanica ili bez njega. Stanice se razmnožavaju (npr. od dvije do tri pasaže) u tikvici s kulturom prije nego što se upotrijebe za rutinsko ispitivanje te se od odmrzavanja trebaju pasažirati najviše 25 puta.
17. Stanice koje su spremne za upotrebu u testu STE zatim se pripremaju u odgovarajućoj gustoći te se nasađuju u ploče s 96 jažica. Preporučuje se gustoća nasađivanja stanica od $6,0 \times 10^3$ stanica po jažici ako se stanice upotrebljavaju četiri dana nakon nasađivanja ili $3,0 \times 10^3$ stanica po jažici ako se stanice upotrebljavaju pet dana nakon nasađivanja, pri volumenu kulture od 200 µl. Stanice koje se upotrebljavaju za test STE i koje se nasade u medij za uzgoj kulture pri odgovarajućoj gustoći dosegnut će konfluenciju od više od 80 % u vrijeme ispitivanja, tj. četiri ili pet dana nakon nasađivanja.

Primjena ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

18. Fiziološka otopina prvi je odabir za otapalo za otapanje ili suspendiranje ispitivanih kemikalija. Ako ispitivana kemikalija pokazuje slabu topljivost ili se u najmanje pet minuta ne može ravnomjerno otopiti ili suspendirati u fiziološkoj otopini, kao drugi izbor za otapalo upotrebljava se 5-postotni DMSO (CAS br. 67-68-5) u fiziološkoj otopini. Kod ispitivanih kemikalija koje se u najmanje pet minuta ne mogu ravnomjerno otopiti ili suspendirati u fiziološkoj otopini ili 5-postotnom DMSO-u u fiziološkoj otopini, kao treći izbor za otapalo upotrebljava se mineralno ulje (CAS br. 8042-47-5) u fiziološkoj otopini.
19. Ispitivane kemikalije ravnomjerno se otapaju ili suspendiraju u odabranom otapalu pri koncentraciji od 5 % (w/w) i dodatno razrjeđuju serijskim deseterostrukim razrjeđivanjem do koncentracije od 0,5 % i 0,05 %. Svaka se kemikalija mora ispitati i pri koncentraciji od 5 % i 0,05 %. Stanice koje se uzgajaju na ploči s 96 jažica izlažu se dozi od 200 µl/jažica otopine (ili suspenzije) ispitivane kemikalije u koncentraciji od 5 % ili 0,05 % na pet minuta na sobnoj temperaturi. Ispitivane kemikalije (tvari s jednim sastojkom ili tvari s više sastojaka ili smjese) smatraju se čistim tvarima i razrjeđuju se ili suspendiraju u skladu s metodom, neovisno o njihovoj čistoći.
20. Medij za uzgoj kulture opisan u stavku 16. upotrebljava se kao kontrola s medijem na svakoj ploči svakog ponavljanja. Nadalje, stanice se izlažu i uzorcima kontrole s otapalom na svakoj ploči svakog ponavljanja. Za otapala navedena u stavku 18. potvrđeno je da ne utječu štetno na vijabilnost stanica SIRC.
21. Kod ispitne metode STE kao pozitivna kontrola na svakoj ploči svakog ponavljanja upotrebljava se 0,01-postotni natrijev lauril sulfat (SLS) u fiziološkoj otopini. Kako bi se izračunala vijabilnost stanica pozitivne kontrole, svaka ploča svakog ponavljanja mora uključivati i fiziološku otopinu kao kontrolu s otapalom.
22. Slijepa proba potrebna je kako bi se utvrdila kompenzacija za optičku gustoću i treba je provesti u jažicama koje sadržavaju samo fiziološku otopinu puferiranu fosfatnim puferom, ali ne kalcij i magnezij (PBS-) ni stanice.
23. Svaki uzorak (ispitivana kemikalija pri koncentraciji od 5 % i 0,05 %, kontrola s medijem, kontrola s otapalom i pozitivna kontrola) treba ispitati triplicat za svako ponavljanje izlaganjem stanica dozi od 200 µl odgovarajuće ispitivane ili kontrolne kemikalije na pet minuta na sobnoj temperaturi.
24. Referentne tvari korisne su za ocjenjivanje potencijala za nadražujuće djelovanje na oči nepoznatih kemikalija iz specifičnog kemijskog razreda ili razreda proizvoda ili za ocjenjivanje relativnog potencijala za nadražujuće djelovanje tvari koja nadražuje oči unutar specifičnog raspona odgovora na nadražujuću tvar.

Mjerenje vijabilnosti stanica

25. Stanice se nakon izlaganja ispiru s 200 µl PBS-a i dodaje im se 200 µl otopine MTT-a (0,5 mg MTT/ml medija za uzgoj kulture). Nakon dvosatnog vremena reakcije u inkubatoru (37 °C, 5 % CO₂), otopina MTT-a pretlače se, MTT formazan ekstrahira se tako da se doda 200 µl 0,04 N klorovodične kiseline i izopropanola tijekom 60 minuta u mraku na sobnoj temperaturi te se apsorbancija otopine MTT formazana mjeri pri 570 nm upotrebom čitača ploča. Ispitivane kemikalije utječu na MTT test (bojilima ili tvarima koje neposredno reduciraju MTT) samo ako se u ispitnom sustavu zadržava znatna količina ispitivane kemikalije nakon ispiranja koje se obavlja nakon izlaganja, a to je slučaj kod 3D tkiva rekonstruirane ljudske rožnice ili rekonstruirane ljudske epiderme, ali nije relevantno za 2D stanične kulture koje se upotrebljavaju za ispitnu metodu STE.

Tumačenje rezultata i model predviđanja

26. Vrijednosti optičke gustoće (OD) za svaku ispitivanu kemikaliju zatim se upotrebljavaju za izračun vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu s otapalom, koja je određena kao 100 %. Relativna vijabilnost stanica izražava se kao postotak i dobiva se tako da se optička gustoća ispitivane kemikalije podijeli optičkom gustoćom kontrole s otapalom nakon što se od obiju vrijednosti oduzme optička gustoća slijepe probe.

$$\text{Vijab.stanica}(\%) = \frac{(\text{OD}_{570\text{ispit.kemikalije}}) - (\text{OD}_{570\text{slijepe probe}})}{(\text{OD}_{570\text{kontr.s otapalom}}) - (\text{OD}_{570\text{slijepe probe}})} \times 100$$

Slično tome, relativna vijabilnost stanica kod svake kontrole s otapalom izražava se kao postotak i dobiva se tako da se optička gustoća svake kontrole s otapalom podijeli optičkom gustoćom kontrole s medijem nakon što se od obiju vrijednosti oduzme optička gustoća slijepe probe.

27. Treba provesti tri neovisna ponavljanja s po tri jažice s ponavljanjem (tj. $n = 9$). Aritmetička sredina triju jažica za svaku ispitivanu kemikaliju i kontrolu s otapalom u svakom neovisnom ponavljanju upotrebljava se za izračun aritmetičke sredine relativne vijabilnosti stanica. Konačna aritmetička sredina vijabilnosti stanica računa se iz tri neovisna ponavljanja.
28. Granične vrijednosti vijabilnosti stanica za utvrđivanje ispitivanih kemikalija koje induciraju tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a) i ispitivanih kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u) navedene su u nastavku.

Tablica 2.

Model predviđanja ispitne metode STE

Vijabilnost stanica		Razvrstavanje prema sustavu GHS UN-a ili CLP-u	Primjenjivost
Pri 5 %	Pri 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Bez kategorije	Tvari i smjese uz iznimku: i. vrlo hlapljivih tvari s tlakom pare većim od 6 kPa ⁽¹⁾ ; i ii. kemikalija u krutom stanju (tvari i smjese) osim površinski aktivnih tvari i smjesa koje se sastoje samo od površinski aktivnih tvari
≤ 70 %	> 70 %	Predviđanje nije moguće	Nije primjenjivo
≤ 70 %	≤ 70 %	Kategorija 1.	Tvari i smjese ⁽²⁾

⁽¹⁾ Smjese koje sadržavaju tvari s tlakom pare većim od 6 kPa treba oprezno ocijeniti kako bi se izbjegla moguća preblaga predviđanja i treba ih ocijeniti na pojedinačnoj osnovi.

⁽²⁾ Na temelju rezultata dobivenih uglavnom s tvarima s jednim sastojkom, iako postoji i ograničena količina podataka o ispitivanju smjesa. Unatoč tomu ova je ispitna metoda tehnički primjenjiva i za ispitivanje tvari s više sastojaka i smjesa. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.

Kriteriji prihvatljivosti

29. Rezultati ispitivanja ocjenjuju se kao prihvatljivi ako su ispunjeni svi sljedeći kriteriji:

- a) optička gustoća kontrole s medijem (izložene mediju za uzgoj kulture) treba biti 0,3 ili veća nakon što se oduzme optička gustoća slijepe probe;

- b) vijabilnost kontrole s otapalom treba biti 80 % ili veća u odnosu na kontrolu s medijem. Ako se u svakom ponavljanju upotrebljava više kontrola s otapalom, svaka kontrola treba pokazivati vijabilnost stanica veću od 80 % kako bi se razvrstale ispitivane kemikalije koje se ispituju tim otapalima;
- c) vijabilnost stanica koja se dobije s pozitivnom kontrolom (0,01 % SLS) treba biti u okviru dvije standardne devijacije prijašnje srednje vrijednosti. Gornju i donju granicu prihvatljivosti za pozitivnu kontrolu treba često ažurirati, tj. svaka tri mjeseca ili svaki put kada se provodi prihvatljivi test u laboratorijima u kojima se testovi ne provode često (tj. rjeđe od jednom mjesečno). Ako laboratorij ne provede dovoljan broj pokusa kako bi se utvrdila statistički pouzdana distribucija pozitivnih kontrola, prihvatljiva je upotreba gornje i donje granice prihvatljivosti koju je utvrdio subjekt koji je razvio metodu, tj. od 21,1 % do 62,3 % prema prijašnjim podacima laboratorija, dok se interna distribucija izrađuje tijekom prvih rutinskih testova;
- d) standardna devijacija konačne vijabilnosti stanica koja se dobije iz tri neovisna ponavljanja treba biti manja od 15 % i kod koncentracije od 5 % i od 0,05 % ispitivane kemikalije.

Ako nije ispunjen jedan ili više od tih kriterija, rezultate treba odbaciti i treba provesti još tri neovisna ponavljanja.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

30. Treba navesti podatke za svaku pojedinačnu jažicu (npr. vrijednosti vijabilnosti stanica) svakog ponavljanja te ukupnu srednju vrijednost, standardnu devijaciju i razvrstavanje.

Izvješće o ispitivanju

31. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija i kontrolne tvari

- tvar s jednim sastojkom: kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS registracijski broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa: opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti gore), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti gore), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- agregatno stanje, hlapljivost, pH-vrijednost, LogP, molekularna masa, kemijski razred i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva relevantna za provedbu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

Uvjeti i postupci ispitne metode

- naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja,
- opis upotrijebljene ispitne metode,

- upotrijebljena stanična linija, njezin izvor, broj pasaže i konfluencija stanica koje se koriste za ispitivanje,
- pojedinosti o primijenjenom ispitnom postupku,
- broj primijenjenih ponavljanja i ponovljenih uzoraka,
- koncentracije ispitivane kemikalije (ako je drukčije od preporučenog),
- obrazloženje za odabir otapala za svaku ispitivanu kemikaliju,
- trajanje izlaganja ispitivanoj kemikaliji (ako je drukčije od preporučenog),
- opis svih izmjena ispitnog postupka,
- opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i odlučivanja,
- upućivanje na prijašnju srednju vrijednost pozitivne kontrole i standardno odstupanje,
- dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitne metode (npr. ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti) ili dokazivanje obnovljive primjene ispitne metode tijekom vremena.

Rezultati

- za svaku ispitivanu kemikaliju i kontrolnu tvar te svaku ispitanu koncentraciju treba navesti tablični prikaz za pojedinačne vrijednosti optičke gustoće po jažici ponovljenog uzorka, aritmetičke srednje vrijednosti optičke gustoće za svako neovisno ponavljanje, postotak vijabilnosti stanica za svako neovisno ponavljanje i konačnu aritmetičku sredinu postotka vijabilnosti stanica i standardnu devijaciju u tri ponavljanja,
- rezultati za kontrolu s medijem, kontrolu s otapalom i pozitivnu kontrolu kojima se dokazuju odgovarajući kriteriji prihvatljivosti istraživanja,
- opis drugih uočenih učinaka,
- ukupno utvrđeno razvrstavanje, s upućivanjem na primijenjeni model predviđanja/kriterije odlučivanja.

Rasprava o rezultatima

Zaključci

LITERATURA

1. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York! & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
2. Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1.–9.

3. Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55.–63.
4. Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22, 760.–770.
5. Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25, 796.–809.
6. Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, str. 1855.–1869.
7. ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Dostupno na: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
8. Poglavlje B.5. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrivanje oka.
9. Saito K, *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
10. Mikkelsen TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.* 1648.–1653.
11. ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Bruxelles, Belgija.
12. Gautheron P, *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 442.–449.
13. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
14. OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

Dodatak

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (13.).

Referentna tvar: tvar koja se primjenjuje kao standard za usporedbu s ispitivanom kemikalijom. Referentna tvar trebala bi imati sljedeća svojstva: i. podrijetlo iz dosljednih i pouzdanih izvora; ii. strukturnu i funkcionalnu sličnost s razredom tvari koje se ispituju; iii. poznata fizikalna/kemijska svojstva; iv. podatke kojima se dokazuju poznati učinci i v. poznatu snagu u rasponu željenog odgovora.

Pristup odozdo prema gore: stupnjeviti pristup koji se primjenjuje za ispitivanu kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da joj nije potrebno razvrstavanje s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje (negativan ishod) u odnosu na druge kemikalije (pozitivan ishod).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Nadraživanje oka: promjena na oku nastala kao rezultat primjene ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koja je potpuno reverzibilna u roku od 21 dana nakon primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „reverzibilni učinci na oko” i „kategorija 2. sustava UN GHS/CLP-a”.

Udio lažno negativnih rezultata: udio svih pozitivnih kemikalija koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao negativne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Stopa lažno pozitivnih rezultata: udio svih negativnih kemikalija koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao pozitivne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Opasnost: inherentno svojstvo nekog agensa ili stanje koje može uzrokovati štetne učinke kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

Kontrola s medijem: netretirani ponovljeni uzorak koji sadržava sve sastavnice ispitnog sustava. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima tretiranim ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdilo je li otapalo u interakciji s ispitnim sustavom.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil plavo tetrazolijev bromid.

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % (w/w) ili većoj te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

OD: optička gustoća.

Pozitivna kontrola: ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da inducira pozitivan odgovor. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživnog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitne metode (10.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (13.).

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (10.).

Teška ozljeda oka: oštećenje očnog tkiva ili ozbiljno fizičko pogoršanje vida izazvano primjenom ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koje nije u potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „ireverzibilni učinci na oko” i „kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a”.

Kontrola s otapalom/nosačem: netretirani uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava, uključujući otapalo ili nosač koji se obrađuje s uzorcima tretiranim ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdio polazni odgovor za uzorke koji se tretiraju ispitivanom kemikalijom otopljenom u istom otapalu ili nosaču. Kada se ispituje s istodobnom kontrolom s medijem, taj uzorak isto tako pokazuje jesu li otapalo ili nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (13.).

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnome stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Površinski aktivna tvar: kemikalija, kao npr. deterdžent, koju se naziva i površinski aktivnim agensom, a kojom se može smanjiti površinska napetost tekućine i time omogućiti pjenjenje i prodiranje u krute tvari; poznata je i kao sredstvo za vlaženje.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Strategija višerazinskog ispitivanja: strategija stupnjevito ispitivanja u kojoj se sve postojeće informacije o ispitivanoj kemikaliji preispituju točno utvrđenim redoslijedom, pri čemu se prije prelaska na sljedeću razinu na svakoj razini primjenjuje postupak analize snage dokaza kako bi se odredilo je li na raspolaganju dovoljno informacija za donošenje odluke o razvrstavanju tvari s obzirom na opasnost. Ako se na temelju postojećih podataka ispitivanoj kemikaliji može pripisati potencijal nadražujućeg djelovanja, daljnje ispitivanje nije potrebno. Ako se na temelju postojećih informacija ispitivanoj kemikaliji ne može pripisati potencijal za nadražujuće djelovanje, provodi se postupak stupnjevito sekvencij-skog ispitivanja na životinjama sve dok se nedvosmisleno ne utvrdi razvrstavanje.

Pristup odozgo prema dolje: stupnjeviti pristup koji se primjenjuje za ispitivanu kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da uzrokuje tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija koje induciraju tešku ozljedu oka (pozitivan ishod) u odnosu na druge kemikalije (negativan ishod).

Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti i opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (1).

Kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a: vidjeti „tešku ozljedu oka”.

Kategorija 2. sustava UN GHS/CLP-a: vidjeti „nadraživanje oka”.

Bez kategorije prema sustavu UN GHS: kemikalije koje nisu razvrstane u kategoriju 1. ili 2. prema sustavu UN GHS/CLP-u, (ili kategoriju 2.A ili 2.B prema sustavu UN GHS).

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

B.69. ISPITNA METODA REKONSTRUIRANOG EPITELA KOJI NALIKUJE LJUDSKOJ ROŽNICI (RhCE) ZA UTVRĐIVANJE KEMIKALIJA KOJE NIJE POTREBNO RAZVRSTATI I OZNAČITI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU OZLJEDU OKA

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 492 (2017.). *Teška ozljeda oka* odnosi se na izazivanje oštećenja tkiva oka ili ozbiljno fizičko pogoršanje vida nakon primjene ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, a koje nije potpuno reverzibilno unutar 21 dana od primjene, kako je utvrđeno Globalno usklađenim sustavom razvrstavanja i označavanja kemikalija Ujedinjenih naroda (UN GHS) (1.) i Uredbom (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označavanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) ⁽¹⁾ Europske unije. Prema sustavu UN GHS i CLP-u *nadraživanje oka* odnosi se na izazivanje promjena u oku nakon primjene ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koje su u potpunosti reverzibilne unutar 21 dana nakon primjene. Ispitivane kemikalije koje induciraju tešku ozljedu oka razvrstane su u kategoriju 1. sustava UN GHS i CLP-a, dok su kemikalije koje induciraju nadraživanje oka razvrstane u kategoriju 2. sustava UN GHS i CLP-a. Ispitivane kemikalije koje su nerazvrstane s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka definirane su kao one koje ne ispunjavaju zahtjeve za razvrstavanje u kategoriju 1. ili 2. (2.A ili 2.B) sustava UN GHS i CLP-a, odnosno one se navode kao kemikalije bez kategorije prema sustavu UN GHS i CLP-u.
2. Procjena teške ozljede oka/nadraživanja oka obično je uključivala upotrebu laboratorijskih životinja (ispitna metoda B.5. (2.)). Odabir najprimjerenije ispitne metode i upotrebu te ispitne metode treba razmotriti u kontekstu Smjernica OECD-a o integriranim pristupima ispitivanju i procjeni za teške ozljede oka i nadraživanje oka (39.).
3. U ovoj ispitnoj metodi opisuje se *in vitro* postupak koji omogućuje utvrđivanje kemikalija (tvari i smjesa) koje nije potrebno razvrstati i označiti s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom UN GHS i CLP-om. U njoj se upotrebljava rekonstruirani epitel koji nalikuje ljudskoj rožnici (RhCE) i koji vjerno oponaša histološka, morfološka, biokemijska i fiziološka svojstva epitela ljudske rožnice. Validirane su još četiri *in vitro* ispitne metode koje se smatraju znanstveno valjanima te su donesene kao ispitne metode B.47. (3.), B.48. (4.), B.61. (5.) i B.68. (6.), a bave se krajnjom točkom teške ozljede oka/nadraživanja oka na zdravlje ljudi.
4. Ova ispitna metoda obuhvaća dva validirana testa u kojima se upotrebljavaju komercijalno dostupni modeli RhCE-a. Validacijske studije za procjenu nadraživanja oka/teške ozljede oka provedene su (7., 8., 9., 10., 11., 12. i 13.) upotrebom testa nadraživanja oka (EIT) EpiOcular™ (EIT) i testa nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice (HCE) SkinEthic™. U svakom od tih testova kao ispitni sustav upotrebljavaju se komercijalno dostupni modeli tkiva RhCE, koje se dalje u tekstu navode kao validirane referentne metode VRM1 i VRM2. Iz tih validacijskih studija i njihovih neovisnih stručnih pregleda (9. i 12.) donesen je zaključak da se testom nadraživanja oka EpiOcular™ i testom nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ mogu točno utvrditi kemikalije (i tvari i smjese) koje nije potrebno razvrstati i označiti s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom UN GHS te su testovi preporučeni kao znanstveno valjani za tu svrhu (13.).
5. Trenutačno je opće prihvaćena činjenica da se u doglednoj budućnosti *in vivo* Draizeovo ispitivanje na oku kunića (2. i 14.) neće moći potpuno zamijeniti nijednom pojedinačnom *in vitro* ispitnom metodom za predviđanje različitih kemijskih razreda u punom rasponu teških ozljeda oka/nadraživanja oka. Međutim, kao potpuna zamjena za Draizeovo ispitivanje na oku mogu se primjenjivati strateške kombinacije nekoliko alternativnih ispitnih metoda u okviru strategija (višerazinskog) ispitivanja, kao što je pristup odozdo prema gore/odozgo prema dolje (15.). Pristup odozdo prema gore (15.) trebalo bi primijeniti kada se na temelju postojećih informacija očekuje da kemikalija neće izazvati znatno nadraživanje oka koje bi zahtijevalo razvrstavanje, dok bi pristup odozgo prema dolje (15.) trebalo primijeniti kada se na temelju postojećih informacija očekuje da će kemikalija izazvati tešku ozljedu oka. Test nadraživanja oka EpiOcular™ i test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ preporučuju se za utvrđivanje kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje u pogledu nadraživanja ili teške ozljede oka u skladu sa sustavom UN GHS/CLP-om (bez kategorije) bez daljnjeg ispitivanja, u okviru strategije ispitivanja kao što je pristup odozdo prema gore/odozgo prema dolje koju su predložili Scott i dr., npr. kao početni korak u pristupu odozdo prema gore ili kao jedan od posljednjih koraka u pristupu odozgo prema dolje (15.). Međutim, test nadraživanja oka EpiOcular™ i test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ nisu namijenjeni za razlikovanje kategorije 1. sustava UN GHS/CLP-a (teška ozljeda oka) od kategorije 2. tog sustava (nadraživanje oka). Ta razlika morat će se

⁽¹⁾ Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označavanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006, SL L 353/1, 31.12.2008.

utvrditi na drugoj razini strategije ispitivanja (15.). Ispitivanu kemikaliju za koju se testom nadraživanja oka EpiOcular™ ili testom nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ utvrdi da ju je potrebno razvrstati u pogledu nadraživanja oka/teške ozljede oka stoga će trebati dodatno ispitati (*in vitro* i/ili *in vivo*) kako bi se došlo do konačnog zaključka (bez kategorije, kategorija 2. ili kategorija 1. prema sustavu UN GHS/CLP-u), npr. upotrebom ispitne metode B.47., B.48., B.61. ili B.68.

6. Svrha je ove ispitne metode opisati postupak koji se primjenjuje za ocjenjivanje potencijala opasnosti ispitivane kemikalije za oko na temelju njezine sposobnosti induciranja citotoksičnosti u modelu tkiva RhCE, kako se izmjeri MTT testom (16.) (vidjeti stavak 21.). Vijabilnost tkiva RhCE nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji utvrđuje se u usporedbi s tkivima koja se tretiraju s tvari za negativnu kontrolu (postotak vijabilnosti) i zatim se upotrebljava za predviđanje potencijala opasnosti ispitivane kemikalije za oko.
7. Za lakšu validaciju novih ili izmijenjenih *in vitro* testova koji se temelje na RhCE-u i koji su slični testu nadraživanja oka EpiOcular™ i testu nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ dostupni su zahtjevi izvedbe (17.), u skladu s načelima Smjernice OECD-a br. 34 (18.) te oni omogućuju pravovremenu izmjenu Smjernice OECD-a za ispitivanje 492 radi uključivanja tih načela. Uzajamno prihvaćanje podataka na temelju sporazuma OECD-a jamči se samo za testove koji su validirani u skladu sa zahtjevima izvedbe ako je OECD pregledao te testove i uključio ih u odgovarajuću smjernicu OECD-a za ispitivanje.

DEFINICIJE

8. Definicije su navedene u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

9. Ova ispitna metoda temelji se na komercijalnim trodimenzionalnim modelima tkiva RhCE koji se proizvode upotrebom primarnih ljudskih epidermalnih keratinocita (tj. EpiOcular™ OCL-200) ili ljudskih imortaliziranih epitelnih stanica rožnice (tj. SkinEthic™ HCE/S). Modeli tkiva RhCE EpiOcular™ OCL-200 i SkinEthic™ HCE/S slični su *in vivo* trodimenzionalnoj strukturi epitela rožnice i proizvode se upotrebom stanica vrste koja se proučava (19. i 20.). Nadalje, testovima se izravno mjeri citotoksičnost koja je rezultat prolaska kemikalije kroz rožnicu i izazivanja oštećenja stanica i tkiva; citotoksični odgovor zatim određuje ukupni ishod *in vivo* teške ozljede oka/nadraženosti oka. Do oštećenja stanica može doći preko nekoliko načina djelovanja (vidjeti stavak 20.), ali citotoksičnost ima važnu, a možda i primarnu, mehanističku ulogu u određivanju ukupnog odgovora na kemikaliju u obliku teške ozljede oka/nadraživanja oka, koja se *in vivo* uglavnom očituje u pojavi zamućenja rožnice, iritisa, crvenila konjunktive i/ili kemoze konjunktive, neovisno o fizikalno-kemijskim procesima na kojima se temelji oštećenje tkiva.
10. U validacijskoj studiji na kojoj se temelji ova ispitna metoda ispitan je širok raspon kemikalija, koje obuhvaćaju vrlo različite vrste kemikalija, kemijske razrede, molekularne mase, vrijednosti LogP, kemijske strukture itd. Validacijska baza podataka za test nadraživanja oka EpiOcular™ sadržavala je ukupno 113 kemikalija, koje su obuhvaćale 95 različitih organskih funkcionalnih skupina u skladu s analizom OECD-ova alata QSAR (8.). Većinu tih kemikalija činile su tvari s jednim sastojkom, ali u studiju je uključeno i nekoliko tvari s više sastojaka (uključujući tri homopolimera, pet kopolimera i deset kvazipolimera). Kad je riječ o agregatnom stanju i kategorijama sustava UN GHS/CLP-a, 113 ispitanih kemikalija distribuirano je na sljedeći način: 13 tekućina iz kategorije 1., 15 kemikalija u krutom stanju iz kategorije 1., šest tekućina iz kategorije 2.A, deset kemikalija u krutom stanju iz kategorije 2.A, sedam tekućina iz kategorije 2.B, sedam kemikalija u krutom stanju iz kategorije 2.B, 27 tekućina bez kategorije i 28 kemikalija u krutom stanju bez kategorije (8.). Validacijska baza podataka za test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ sadržavala je ukupno 200 kemikalija, koje su obuhvaćale 165 različitih organskih funkcionalnih skupina (8., 10. i 11.). Većinu tih kemikalija činile su tvari s jednim sastojkom, ali u studiju je uključeno i nekoliko tvari s više sastojaka (uključujući deset polimera). Kad je riječ o agregatnom stanju i kategorijama sustava UN GHS/CLP-a, 200 ispitanih kemikalija distribuirano je na sljedeći način: 27 tekućina iz kategorije 1., 24 kemikalije u krutom stanju iz kategorije 1., 19 tekućina iz kategorije 2.A, deset kemikalija u krutom stanju iz kategorije 2.A, devet tekućina iz kategorije 2.B, osam kemikalija u krutom stanju iz kategorije 2.B, 50 tekućina bez kategorije i 53 kemikalije u krutom stanju bez kategorije (10. i 11.).

11. Ova je ispitna metoda primjenjiva na tvari i smjese te na kemikalije u krutom stanju, tekućine, polukrute kemikalije i voskove. Tekućine mogu biti vodene i bezvodne; krute tvari mogu biti topljive ili netopljive u vodi. Krute tvari prije primjene treba samljati u sitni prah kad god je to moguće; nije potrebna nikakva druga prethodna obrada uzorka. Plinovi i aerosoli nisu ocijenjeni u validacijskoj studiji. Iako je moguće da se oni mogu ispitati upotrebom tehnologije RhCE, trenutačnom ispitnom metodom nije omogućeno ispitivanje plinova i aerosola.
12. Ispitivane kemikalije koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan (prirodno ili nakon tretiranja) i ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati vitalnu boju MTT (na MTT formazan) mogu utjecati na mjerenje vijabilnosti tkiva te se kod njih trebaju upotrebljavati prilagođene kontrole za ispravke. Vrsta prilagođenih kontrola koja može biti potrebna mijenjat će se ovisno o vrsti interferencije koju proizvodi ispitivana kemikalija i postupku koji se upotrebljava za kvantificiranje MTT formazana (vidjeti stavke 36.–42.).
13. Rezultati dobiveni u predvalidacijskoj (21. i 22.) i cjelokupnoj validacijskoj (8., 10. i 11.) studiji pokazali su da se i test nadraživanja oka EpiOcular™ i test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ mogu prenijeti u laboratorije koji još nikada nisu provodili te testove te da su obnovljivi unutar jednog laboratorija i između više laboratorija. Na temelju tih studija razina obnovljivosti u smislu usklađenosti predviđanja koja se može očekivati iz testa nadraživanja oka EpiOcular™ na temelju podataka o 113 kemikalija iznosi približno 95 % unutar laboratorija i 93 % između više laboratorija. Razina obnovljivosti u smislu usklađenosti predviđanja koja se može očekivati iz testa nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ na temelju podataka o 120 kemikalija iznosi približno 92 % unutar laboratorija i 95 % između više laboratorija.
14. Test nadraživanja oka EpiOcular™ može se primjenjivati za utvrđivanje kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS i CLP-om. Uzimajući u obzir podatke dobivene u validacijskoj studiji (8.), test nadraživanja oka EpiOcular™ ima ukupnu točnost od 80 % (na temelju 112 kemikalija), osjetljivost od 96 % (na temelju 57 kemikalija), udio lažno negativnih rezultata od 4 % (na temelju 57 kemikalija), specifičnost od 63 % (na temelju 55 kemikalija) i udio lažno pozitivnih rezultata od 37 % (na temelju 55 kemikalija), u usporedbi s referentnim podacima *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.), razvrstano u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS i CLP-om. Studija u kojoj je 97 tekućih agrokemij-skih formulacija ispitano testom nadraživanja oka EpiOcular™ pokazala je sličnu uspješnost ispitne metode za tu vrstu smjesa kao što je ona dobivena u validacijskoj studiji (23.). Tih je 97 formulacija distribuirano na sljedeći način: 21 kemikalija iz kategorije 1., 19 kemikalija iz kategorije 2.A, 14 kemikalija iz kategorije 2.B i 43 kemikalije bez kategorije, razvrstano u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS na temelju referentnih podataka *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.). Dobivena je ukupna točnost od 82 % (na temelju 97 formulacija), osjetljivost od 91 % (na temelju 54 formulacije), udio lažno negativnih rezultata od 9 % (na temelju 54 formulacije), specifičnost od 72 % (na temelju 43 formulacije) i udio lažno pozitivnih rezultata od 28 % (na temelju 43 formulacije) (23.).
15. Test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ može se primjenjivati za utvrđivanje kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS i CLP-om. Uzimajući u obzir podatke dobivene u validacijskoj studiji (10. i 11.), test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ ima ukupnu točnost od 84 % (na temelju 200 kemikalija), osjetljivost od 95 % (na temelju 97 kemikalija), udio lažno negativnih rezultata od 5 % (na temelju 97 kemikalija), specifičnost od 72 % (na temelju 103 kemikalije) i udio lažno pozitivnih rezultata od 28 % (na temelju 103 kemikalije), u usporedbi s referentnim podacima *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.), razvrstano u skladu sa sustavom razvrstavanja UN GHS i CLP-om.
16. Udjeli lažno negativnih rezultata dobiveni u oba testa RhCE, s tvarima ili smjesama, ulaze u 12-postotnu ukupnu vjerojatnost da se kemikalije u *in vivo* Draizeovu ispitivanju na oku u ponovljenim testovima utvrde kao kemikalije iz kategorije 2. ili bez kategorije u skladu sa sustavom UN GHS ili CLP-om; uzrok je tomu inherentna varijabilnost

unutar testa u toj metodi (24.). Stope lažno negativnih rezultata dobivene u obje ispitne metode RhCE s tvarima ili smjesama nisu presudne u kontekstu ove ispitne metode jer je sve ispitivane kemikalije kod kojih je vijabilnost tkiva jednaka utvrđenim graničnim vrijednostima ili manja od njih (vidjeti stavak 44.) potrebno dodatno ispitati drugim *in vitro* ispitnim metodama ili, kao posljednja opcija kod kunića, ovisno o regulatornim zahtjevima, upotrebom strategije sekvencijskog ispitivanja u analizi snage dokaza. Ove se ispitne metode mogu primjenjivati za sve vrste kemikalija, pri čemu negativni rezultat treba biti prihvatljiv za nerazvrstavanje kemikalije s obzirom na nadraživanje oka i tešku ozljedu oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS i CLP-u). Prije primjene testa nadraživanja oka EpiOcular™ i testa nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ u skladu s drugim shemama razvrstavanja osim sustava UN GHS/CLP-a trebalo bi se savjetovati s odgovarajućim regulatornim tijelima.

17. Ograničenje je ove ispitne metode to što ne omogućuje razlikovanje nadraživanja oka/reverzibilnih učinaka na oko (kategorija 2.) od teške ozljede oka/ireverzibilnih učinaka na oko (kategorija 1.), kako je utvrđeno sustavom UN GHS i CLP-om, niti razlikovanje kemikalija nadražujućih za oči (neobavezna kategorija 2.A) od kemikalija blago nadražujućih za oči (neobavezna kategorija 2.B), kako je utvrđeno sustavom UN GHS (1.). U te je svrhe potrebno daljnje ispitivanje drugim *in vitro* ispitnim metodama.
18. U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana kemikalija” upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje ⁽²⁾ te se ne odnosi na primjenjivost ispitne metode RhCE za ispitivanje tvari i/ili smjesa.

NAČELO ISPITIVANJA

19. Ispitivana kemikalija lokalno se nanosi na najmanje dva trodimenzionalna modela tkiva RhCE, a vijabilnost tkiva mjeri se nakon izlaganja i razdoblja inkubacije nakon tretiranja. Tkiva RhCE rekonstruiraju se iz primarnih ljudskih epidermalnih keratinocita ili ljudskih immortaliziranih epitelih stanica rožnice, koje su uzgajane nekoliko dana kako bi tvorile stratificirani, visoko izdiferencirani ljuskavi epitel koji je morfološki sličan onom koji se nalazi u ljudskoj rožnici. Model tkiva EpiOcular™ RhCE sastoji se od najmanje tri vijabilna sloja stanica i nekeratinizirane površine, koji imaju strukturu koja nalikuje rožnici i analogna je strukturi *in vivo*. Model tkiva SkinEthic™ HCE RhCE sastoji se od najmanje četiri vijabilna sloja stanica, uključujući stupičaste bazalne stanice, prijelazne krilate stanice i površinske ljuskave stanice koje su slične uobičajenom epitelu ljudske rožnice (20. i 26.).
20. Kemijski inducirana teška ozljeda oka/nadraživanje oka, koji se *in vivo* uglavnom očituju kao zamućenje rožnice, iritis, crvenilo konjunktive i/ili kemoza konjunktive, rezultat je niza događaja koji započinju prodiranjem kemikalije kroz rožnicu i/ili konjunktivu i oštećenjem stanica. Do oštećenja stanica može doći preko nekoliko načina djelovanja, uključujući: liziranje stanične membrane (npr. površinski aktivnim tvarima, organskim otapalima); koagulaciju makromolekula (osobito proteina) (npr. površinski aktivnim tvarima, organskim otapalima, lužinama i kiselinama); saponifikaciju lipida (npr. lužinama); i alkilaciju ili druge kovalentne interakcije s makromolekulama (npr. izbjeljivačima, peroksidima i alkilatorima) (15., 27. i 28.). Međutim, pokazalo se da citotoksičnost ima važnu, a možda i primarnu, mehanicističku ulogu u određivanju ukupnog odgovora na kemikaliju u obliku teške ozljede oka/nadraživanja oka, neovisno o fizikalno-kemijskim procesima na kojima se temelji oštećenje tkiva (29. i 30.). Nadalje, potencijal kemikalije da izazove tešku ozljedu oka/nadraživanje oka prvenstveno je određen razmjerom početne ozljede (31.), koji je u korelaciji s razmjerom smrti stanica (29.) i s razmjerom naknadnih odgovora i konačnih ishoda (32.). Stoga slabo nadražujuće kemikalije obično utječu samo na površinski epitel rožnice, blago i umjereno nadražujuće kemikalije uglavnom oštećuju epitel i površinsku stromu, a jako nadražujuće kemikalije oštećuju epitel, dubinsku stromu, a ponekad i endotel rožnice (30. i 33.). Mjerenje vijabilnosti modela tkiva RhCE nakon lokalnog izlaganja ispitivanoj kemikaliji radi utvrđivanja kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na tešku ozljedu oka/nadraživanje oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS i CLP-u) temelji se na pretpostavci da će sve kemikalije koje induciraju tešku ozljedu oka ili nadraživanje oka inducirati citotoksičnost u epitelu rožnice i/ili konjunktivi.

⁽²⁾ U lipnju 2013. na zajedničkom sastanku OECD-a dogovoreno je da bi u novim i ažuriranim smjernicama OECD-a za ispitivanje, kada je to moguće, sada trebalo dosljednije upotrebljavati termin „ispitivana kemikalija” kojim se opisuje ono što se ispituje.

21. Vijabilnost tkiva u modelima RhCE obično se mjeri enzimskom konverzijom vitalne boje MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol bromid; tiazolil plavo tetrazolijev bromid; CAS broj 298-93-1], koju vrše vijabilne stanice tkiva, u sol plavog MTT formazana koja se kvantitativno mjeri nakon ekstrakcije iz tkiva (16.). Kemikalije koje ne treba razvrstati i označiti u skladu sa sustavom UN GHS/CLP-om (bez kategorije) utvrđene su kao kemikalije koje ne smanjuju vijabilnost tkiva ispod utvrđenog praga (tj. vijabilnost tkiva > 60 % u testu EIT EpiOcular™ i testu EITL⁽³⁾ s HCE-om SkinEthic™ ili > 50 % u testu EITS⁽⁴⁾ s HCE-om SkinEthic™) (vidjeti stavak 44.).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

22. Prije rutinske upotrebe testova RhCE u regulatorne svrhe laboratoriji trebaju dokazati tehničku osposobljenost tako da točno predvide 15 kemikalija koje služe za dokazivanje osposobljenosti navedenih u tablici 1. Te su kemikalije odabrane među kemikalijama upotrijebljenima u validacijskim studijama validiranih referentnih metoda (8., 10. i 11.). Odabir uključuje, u mjeri u kojoj je to moguće, kemikalije: i. koje obuhvaćaju različita agregatna stanja; ii. koje obuhvaćaju puni raspon odgovora u obliku *in vivo* teške ozljede oka/nadraživanja oka na temelju visokokvalitetnih rezultata dobivenih u referentnom *in vivo* ispitivanju na oku kunića (ispitna metoda B.5.) (2. i 14.) te prema sustavu razvrstavanja UN GHS (tj. kategorije 1., 2.A, 2.B ili bez kategorije) (1.) i CLP-u (tj. kategorije 1., 2. ili bez kategorije); iii. koje obuhvaćaju različite *in vivo* pokretače razvrstavanja (24. i 25.); iv. koje su reprezentativne za kemijske razrede koji su korišteni u validacijskoj studiji (8., 10. i 11.); v. koje obuhvaćaju dobru i široku zastupljenost organskih funkcionalnih skupina (8., 10. i 11.); vi. koje imaju dobro utvrđene kemijske strukture (8., 10. i 11.); vii. koje su obojene i/ili koje izravno reduciraju MTT; viii. koje su dale ponovljive rezultate u ispitnim metodama RhCE tijekom njihovih validacija; ix. koje su točno predviđene ispitnim metodama RhCE tijekom njihovih validacijskih studija; x. koje obuhvaćaju puni raspon *in vitro* odgovora na temelju visokokvalitetnih podataka iz ispitnih metoda RhCE (vijabilnost od 0 do 100 %); xi. koje su komercijalno dostupne; i xii. koje nisu povezane s neprimjereno visokim troškovima nabave i/ili zbrinjavanja. U situacijama kada navedena kemikalija nije dostupna ili se ne može upotrijebiti iz drugih opravdanih razloga, mogla bi se upotrijebiti druga kemikalija koja ispunjava prethodno opisane kriterije, npr. kemikalije koje su upotrijebljene u validaciji validirane referentne metode. Međutim, takva odstupanja treba obrazložiti.

Tablica 1.

Popis kemikalija koje služe za dokazivanje osposobljenosti

Kemijski naziv	CAS br.	Organska funkcionalna skupina ⁽¹⁾	Agregatno stanje	Vijabilnost za VRM1 (%) ⁽²⁾	Vijabilnost za VRM2 (%) ⁽³⁾	Predviđanje VRM-a	Tvar koja reducira MTT	Interferencija s bojom
----------------	---------	--	------------------	--	--	-------------------	------------------------	------------------------

In vivo kategorija 1.⁽⁴⁾

Metil-tioglikolat	2365-48-2	Ester karboksilne kiseline; tioalkohol	Tekuće	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Predviđanje nije moguće	Da (jako)	Ne
Hidroksietil-akrilat	818-61-1	Akrlat; alkohol	Tekuće	7,5 ± 4,7 ⁽⁵⁾	1,6 ± 1,0	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
2,5-dimetil-2,5-heksandiol	110-03-2	Alkohol	Kruto	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
Natrijev oksalat	62-76-0	Okso-karboksilna kiselina	Kruto	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne

In vivo kategorija 2.A⁽⁴⁾

2,4,11,13-tetraazatetradekan-diimidamid, N,N'-bis(4-klorfenil)-3,12-diimino-, di-D-glukonat (20 %, vodena otopina) ⁽⁶⁾	18472-51-0	Aromatski heterociklički halid; aril halid; dihidroksilna skupina; gvanidin	Tekuće	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Predviđanje nije moguće	Ne	Da (slabo)
---	------------	---	--------	-----------	-----------	-------------------------	----	------------

⁽³⁾ EITL: test nadraživanja oka (EIT) za tekućine s epitelom ljudske rožnice (HCE) SkinEthic™.⁽⁴⁾ EITS: test nadraživanja oka (EIT) za kemikalije u krutom stanju s epitelom ljudske rožnice (HCE) SkinEthic™.

Kemijski naziv	CAS br.	Organska funkcionalna skupina ⁽¹⁾	Agre-gatno stanje	Vijabilnost za VRM1 (%) ⁽²⁾	Vijabilnost za VRM2 (%) ⁽³⁾	Predviđanje VRM-a	Tvar koja reducira MTT	Interfe-rencija s bojom
Natrijev benzoat	532-32-1	Aril; karboksilna kiselina	Kruto	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne

In vivo kategorija 2.B ⁽⁴⁾

Dietiltoluamid	134-62-3	Benzamid	Tekuće	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne
2,2-dimetil-3-metilenbiklo [2.2.1] heptan	79-92-5	Alkan, razgranat tercijarnim ugljikom; alken; bicikloheptan; karbociklički spojevi s premoštenim prstenastim sustavom; cikloalkan	Kruto	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Predviđanje nije moguće	Ne	Ne

In vivo bez kategorije ⁽⁴⁾

1-etil-3-metilimidazolium etilsulfat	342573-75-5	Alkoksi; amonijeva sol; aril; imidazol; sulfat	Tekuće	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Bez kat.	Ne	Ne
Dikaprilil eter	629-82-3	Alkoksi; eter	Tekuće	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Bez kat.	Ne	Ne
Piperonil butoksid	51-03-6	Alkoksi; benzodiol; sol; benzil; eter	Tekuće	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Bez kat.	Ne	Ne
Polietilen glikol (PEG-40) hidrogeniranog ricinusovog ulja	61788-85-0	Acilal; alkohol; alil; eter	Viskozno	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Bez kat.	Ne	Ne
1-(4-klorfenil)-3-(3,4-diklorfenil) urea	101-20-2	Aromatski heterociklički halid; aril halid; derivati uree	Kruto	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Bez kat.	Ne	Ne
2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)-fenol)	103597-45-1	Alkan razgranat kvarternim ugljikom; vezani karbociklički aromatski spoj; vezani zasićeni heterociklički spojevi; prekursori kinoidnih spojeva; tert-butil	Kruto	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Bez kat.	Ne	Ne

Kemijski naziv	CAS br.	Organska funkcionalna skupina ⁽¹⁾	Agre-gatno stanje	Vijabilnost za VRM1 (%) ⁽²⁾	Vijabilnost za VRM2 (%) ⁽³⁾	Predviđanje VRM-a	Tvar koja reducira MTT	Interferencija s bojom
Kalijev tetrafluoroborat	14075-53-7	Anorganska sol	Kruto	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Bez kat.	Ne	Ne

Kratice:

CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima; UN GHS = Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (1.); VRM1 = validirana referentna metoda, EpiOcular™ EIT; VRM2 = validirana referentna metoda, SkinEthic™ HCE EIT; Interferencija s bojom = interferencija s bojom kod mjerenja standardne apsorbancije (optička gustoća (OD)) MTT formazana.

⁽¹⁾ Organska funkcionalna skupina dodijeljena u skladu s ugniježđenom analizom OECD-ova alata 3.1. (8.).

⁽²⁾ Na temelju rezultata dobivenih testom nadraživanja oka EpiOcular™ u validacijskoj studiji nadraživanja oka (EIVS) EURL ECVAM-a/udruženja Cosmetics Europe (8.).

⁽³⁾ Na temelju rezultata dobivenih testom nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ u validacijskoj studiji (10. i 11.).

⁽⁴⁾ Na temelju rezultata *in vivo* ispitivanja na oku kunića (ispitna metoda B.5./Smjernica OECD-a za ispitivanje 405) (2. i 14.) i uz primjenu sustava UN GHS.

⁽⁵⁾ Na temelju rezultata dobivenih u konzorciju CEFIC za studiju o strategiji *in vitro* ispitivanja nadraživanja oka (CON4EI).

⁽⁶⁾ Razvrstavanje u kategoriju 2.A ili 2.B ovisi o tumačenju kriterija sustava UN GHS za razlikovanje tih dviju kategorija, odnosno je li za razvrstavanje u kategoriju 2.A potrebno da jedna od tri životinje ili dvije od tri životinje imaju učinke sedmog dana. *In vivo* istraživanje uključivalo je tri životinje. Osim zamućenja rožnice kod jedne životinje sve su krajnje točke ponovno imale vrijednost nula do sedmog dana ili ranije. Jedna životinja koja se nije potpuno oporavila do sedmog dana imala je vrijednost zamućenja rožnice 1 (sedmog dana), a potpuno se oporavila devetog dana.

23. U okviru ispitivanja osposobljenosti preporučuje se da korisnici po primitku provjere svojstva barijere tkiva u skladu sa specifikacijama proizvođača modela tkiva RhCE (vidjeti stavke 25., 27. i 30.) To je posebno važno ako se tkiva šalju na velike udaljenosti/tijekom dugih vremenskih razdoblja. Nakon što se ispitivanje uspješno uspostavi te nakon što se stekne i dokaže osposobljenost u pogledu njegove upotrebe, takva rutinska provjera neće biti potrebna. Međutim, kod rutinske upotrebe ispitivanja preporučuje se daljnje ocjenjivanje svojstava barijere u pravilnim vremenskim razmacima.

POSTUPAK

24. Ovom ispitnom metodom trenutačno su obuhvaćeni znanstveno valjani test nadraživanja oka EpiOcular™ i test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ (9., 12. i 13.), koji se nazivaju validirane referentne metode (VRM1 i VRM2). Dostupni su standardni operativni postupci (SOP) za ispitnu metodu RhCE te bi ih trebalo primjenjivati pri provedbi i primjeni ispitnih metoda u laboratoriju (34. i 35.). U sljedećim stavcima i Dodatku 2. opisuju se glavni elementi i postupci testova RhCE.

ELEMENTI ISPITNE METODE RHCE

Opći uvjeti

25. Treba upotrebljavati relevantne ljudske stanice za rekonstrukciju trodimenzionalnog tkiva epitela koje nalikuje rožnici, a koje bi se trebalo sastojati od progresivno stratificiranih, ali ne i kornificiranih stanica. Model tkiva RhCE priprema se u umetcima s poroznom sintetičkom membranom kroz koju hranjive tvari mogu proći do stanica. U rekonstruiranom epitelu koji nalikuje rožnici trebaju biti prisutni višestruki slojevi vijabilnih, nekeratiniziranih stanica epitela. Model tkiva RhCE trebao bi imati površinu epitela koja je u izravnom dodiru sa zrakom kako bi se omogućilo izravno lokalno izlaganje ispitivanim kemikalijama na način koji je sličan načinu na koji bi epitel rožnice bio izložen *in vivo*. Model tkiva RhCE treba činiti funkcionalnu barijeru koja je dovoljno otporna da zaustavi brzi prodor citotoksičnih referentnih tvari, npr. Tritona X-100 ili natrijeva dodecil-sulfata (SDS). Treba dokazati funkciju barijere, a ona se može ocijeniti utvrđivanjem ili vremena izlaganja potrebnog za smanjenje vijabilnosti tkiva za 50 % (ET₅₀) nakon primjene referentne tvari u utvrđenoj, fiksnoj koncentraciji (npr. 100 µl 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100) ili koncentracije pri kojoj referentna tvar smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % (IC₅₀) nakon fiksnog vremena izlaganja (npr. 30 minuta tretiranja s 50 µl SDS-a) (vidjeti stavak 30.). Model tkiva RhCE treba biti dovoljno nepropustan da spriječi prolazak ispitivane kemikalije oko ruba vijabilnog tkiva, jer bi to moglo značiti loše modeliranje izlaganja rožnice. Ljudske stanice koje se upotrebljavaju za utvrđivanje modela tkiva RhCE ne smiju biti onečišćene bakterijama, virusima, mikoplazmom i gljivicama. Dobavljač treba provjeriti je li model tkiva sterilan i utvrditi da nema kontaminacije gljivicama i bakterijama.

Funkcionalni uvjeti

Vijabilnost

26. Za kvantifikaciju vijabilnosti tkiva upotrebljava se MTT test (16.). Vijabilne stanice modela tkiva RhCE reduciraju vitalnu boju MTT u talog plavog MTT formazana, koji se zatim ekstrahira iz tkiva izopropanolom (ili sličnim

otapalom). Ekstrahirani MTT formazan može se kvantificirati upotrebom mjerenja standardne apsorbancije (optička gustoća (OD)) ili postupkom HPLC/UPLC spektrofotometrije (36.). Optička gustoća (OD) samog ekstrakcijskog otapala treba biti dovoljno mala, tj. $OD < 0,1$. Korisnici modela tkiva RhCE trebali bi osigurati da svaka šarža modela tkiva RhCE koji se upotrebljava ispunjava utvrđene kriterije za negativnu kontrolu. Rasponi prihvatljivosti za vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole za validirane referentne metode navedeni su u tablici 2. Korisnik HPLC/UPLC spektrofotometrije trebao bi upotrebljavati raspone optičke gustoće negativne kontrole navedene u tablici 2. kao kriterij prihvatljivosti za negativnu kontrolu. U ispitnom izvješću potrebno je dokumentirati da su tkiva tretirana s tvari za negativnu kontrolu stabilna u kulturi (daju slična mjerenja vijabilnosti tkiva) za vrijeme trajanja ispitnog izlaganja. Proizvođač tkiva trebao bi slijediti isti postupak kao dio kontrole kvalitete šarže tkiva, ali u tom se slučaju mogu primjenjivati različiti kriteriji prihvatljivosti od kriterija navedenih u tablici 2. Raspon prihvatljivosti (gornja i donja granica) za vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole (u uvjetima ispitne metode za kontrolu kvalitete) treba utvrditi subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili dobavljač tog modela.

Tablica 2.

Rasponi prihvatljivosti vrijednosti optičke gustoće negativne kontrole (za korisnike testa)

Test	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EIT EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 (za protokole za tekućine i krute tvari)	$> 0,8$ ⁽¹⁾	$< 2,5$
EIT s HCE-om SkinEthic™ (HCE/S) – VRM2 (za protokole za tekućine i krute tvari)	$> 1,0$	$\leq 2,5$

⁽¹⁾ U ovom ograničenju prihvatljivosti uzima se u obzir mogućnost produljenog vremena otpreme/skladištenja (npr. > 4 dana), za što se pokazalo da ne utječe na uspješnost ispitne metode (37.).

Funkcija barijere

27. Model tkiva RhCE treba biti dovoljno debeo i čvrst kako bi onemogućio brzu penetraciju citotoksičnih referentnih tvari, kako je procijenjeno npr. vrijednošću ET_{50} (Triton X-100) ili IC_{50} (SDS) (tablica 3.). Subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili njegov prodavatelj trebao bi pri dostavi tkiva krajnjem korisniku dokazati funkciju barijere svake šarže modela tkiva RhCE koji se upotrebljava (vidjeti stavak 30.).

Morfologija

28. Histološko ispitivanje modela tkiva RhCE trebalo bi pokazivati strukturu epitela koja nalikuje ljudskoj rožnici (uključujući barem tri sloja vijabilnih stanica epitela i nekeratiniziranu površinu). Subjekt koji je razvio model ili dobavljač utvrdio je odgovarajuću morfologiju za validirane referentne metode te je stoga korisnik ispitne metode ne mora ponovno dokazivati za svaku šaržu tkiva.

Obnovljivost

29. Rezultati pozitivne i negativne kontrole ispitne metode trebaju dokazati obnovljivost tijekom vremena.

Kontrola kvalitete (KK)

30. Model tkiva RhCE trebao bi se upotrebljavati samo ako subjekt koji ga je razvio ili dobavljač dokaže da svaka šarža upotrijebljenog modela tkiva RhCE ispunjava definirane kriterije za odobrenje proizvoda, među kojima su najvažniji vijabilnost (stavak 26.) i funkcija barijere (vidjeti stavak 27.). Raspon prihvatljivosti (gornje i donje granice) za funkcije barijere, kako se mjeri vrijednošću ET_{50} ili IC_{50} (vidjeti stavke 25. i 26.), treba utvrditi subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili njegov dobavljač. Raspon prihvatljivosti vrijednosti ET_{50} i IC_{50} koji subjekt koji je razvio modele tkiva RhCE (koji se upotrebljavaju u validiranim referentnim metodama) ili njihov dobavljač upotrebljava kao kriterij za kontrolu kvalitete šarže naveden je u tablici 3. Subjekt koji je razvio model tkiva RhCE ili njegov dobavljač treba korisnicima ispitne metode dostaviti podatke kojima se dokazuje usklađenost sa svim kriterijima za odobrenje proizvoda kako bi korisnici mogli uključiti te informacije u izvješće o ispitivanju. Samo rezultati dobiveni s tkivima koja ispunjavaju sve te kriterije za odobrenje proizvoda mogu se prihvatiti za pouzdano predviđanje kemikalija koje ne treba razvrstati i označiti s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka u skladu sa sustavom UN GHS/CLP-om.

Tablica 3.

Kriterij za kontrolu kvalitete šarže

Test	Donja granica prihvatljivosti	Gornja granica prihvatljivosti
EIT EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 (100 µl 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100)	ET ₅₀ = 12,2 min	ET ₅₀ = 37,5 min
EIT s HCE-om SkinEthic™ (HCE/S) – VRM2 (30 minuta tretiranja s 50 µl SDS-a)	IC ₅₀ = 1 mg/ml	IC ₅₀ = 3,2 mg/ml

Primjena ispitivane kemikalije i kontrolnih tvari

31. Za svaku ispitivanu kemikaliju i svaku kontrolnu tvar trebalo bi upotrijebiti najmanje dva ponovljena uzorka tkiva u svakom ciklusu. Upotrebljavaju se dva različita protokola za tretiranje, jedan za tekuće ispitivane kemikalije i jedan za kemikalije u krutom stanju (34. i 35.). Kod obje metode i oba protokola površinu modela tkiva treba navlažiti Dulbeccovom fiziološkom otopinom puferiranom fosfatnim puferom bez kalcija i magnezija (DPBS bez Ca²⁺/Mg²⁺) prije primjene ispitivanih kemikalija kako bi se oponašali vlažni uvjeti ljudskog oka. Tretiranje tkiva započinje izlaganjem ispitivanim kemikalijama i kontrolnim tvarima. Kod oba protokola za tretiranje u obje validirane ispitne metode treba primijeniti dovoljnu količinu ispitivane kemikalije ili kontrolne tvari kako bi se ravnomjerno prekrila površina epitela tako da se izbjegne beskonačna doza (vidjeti stavke 32. i 33.) (Dodatak 2.).
32. Ispitivane kemikalije koje se mogu pipetirati pri temperaturi od 37 °C ili nižoj (prema potrebi upotrebom pipete koja radi na načelu pozitivnog istisnog volumena) tretiraju se kao tekućine u validiranim referentnim metodama, a u suprotnom bi se trebale tretirati kao kemikalije u krutom stanju (vidjeti stavak 33.). U validiranim referentnim metodama tekuće ispitivane kemikalije ravnomjerno se nanose na površinu tkiva (tj. primjenjuje se najmanje 60 µl/cm²) (vidjeti Dodatak 2., 33. i 34.). Kapilarnost (učinak površinske napetosti) do koje može doći zbog malih volumena koji se primjenjuju na umetak (na površinu tkiva) treba izbjegavati u mjeri u kojoj je to moguće kako bi se zajamčilo točno doziranje tkiva. Tkiva tretirana tekućim ispitivanim kemikalijama inkubiraju se 30 minuta u standardnim uvjetima kulture (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, relativna vlažnost ≥ 95 %). Na kraju razdoblja izlaganja tekuću ispitivanu kemikaliju i kontrolne tvari treba pažljivo ukloniti s površine tkiva obilnim ispiranjem DPBS-om bez Ca²⁺/Mg²⁺ na sobnoj temperaturi. Nakon tog koraka ispiranja slijedi uranjanje u svježi medij na sobnoj temperaturi nakon izlaganja (kako bi se uklonila ispitivana kemikalija koju je tkivo apsorbiralo) u unaprijed utvrđenom razdoblju koje ovisi o upotrijebljenoj validiranoj referentnoj metodi. Samo u slučaju metode VRM1 prije provedbe MTT testa primjenjuje se inkubacija nakon izlaganja u svježem mediju u standardnim uvjetima kulture (vidjeti Dodatak 2., 34. i 35.).
33. Ispitivane kemikalije koje se ne mogu pipetirati pri temperaturama do 37 °C u validiranim referentnim metodama tretiraju se kao krute tvari. Količina ispitivane kemikalije koja se primjenjuje treba biti dovoljna kako bi se prekrila cijela površina tkiva, tj. treba primijeniti najmanje 60 mg/cm² (Dodatak 2.). Kad god je to moguće, kemikalije u krutom stanju treba ispitivati u obliku sitnog praha. Tkiva tretirana ispitivanim kemikalijama u krutom stanju inkubiraju se u unaprijed utvrđenom razdoblju (ovisno o upotrijebljenoj validiranoj referentnoj metodi) u standardnim uvjetima kulture (vidjeti Dodatak 2., 34. i 35.). Na kraju razdoblja izlaganja ispitivanu kemikaliju u krutom stanju i kontrolne tvari treba pažljivo ukloniti s površine tkiva obilnim ispiranjem DPBS-om bez Ca²⁺/Mg²⁺ na sobnoj temperaturi. Nakon tog koraka ispiranja, a prije provedbe MTT testa, nakon izlaganja slijedi uranjanje u svježi medij na sobnoj temperaturi (kako bi se uklonila ispitivana kemikalija koju je tkivo apsorbiralo) u unaprijed utvrđenom razdoblju, koje ovisi o upotrijebljenoj validiranoj referentnoj metodi, te inkubacija u svježem mediju nakon izlaganja u standardnim uvjetima kulture (vidjeti Dodatak 2., 34. i 35.).

34. U svaki ciklus treba uključiti istodobne negativne i pozitivne kontrole kako bi se dokazalo da su vijabilnost (utvrđena negativnom kontrolom) i osjetljivost (utvrđena pozitivnom kontrolom) tkiva u okviru raspona prihvatljivosti koji su utvrđeni na temelju prijašnjih podataka. Istodobna negativna kontrola pruža i osnovicu (100-postotna vijabilnost) za izračun postotka relativne vijabilnosti tkiva tretiranih ispitivanom kemikalijom (%vijabilnost_{test}). Kao tvar za pozitivnu kontrolu za upotrebu s validiranim referentnim metodama preporučuje se čisti metil-acetat (CAS br. 79-20-9, komercijalno dostupan kod npr. društva Sigma-Aldrich, Cat# 45997; tekućina). Kao tvari za negativnu kontrolu za upotrebu s metodama VRM1 i VRM2 preporučuju se ultračisti H₂O i DPBS bez Ca²⁺/Mg²⁺. Te su se kontrolne tvari upotrebljavale u validacijskim studijama validiranih referentnih metoda i za njih postoji najviše prijašnjih podataka. Upotrebu primjerenih alternativnih tvari za pozitivnu i negativnu kontrolu treba znanstveno i primjereno obrazložiti. Negativne i pozitivne kontrole treba ispitati primjenom istih protokola kao što su oni koji su upotrijebljeni za ispitivanje kemikalije uključene u ciklus (tj. za tekućine i/ili kemikalije u krutom stanju). Nakon te primjene slijedi tretiranje izlaganjem, ispiranje, uranjanje nakon izlaganja i inkubacija nakon izlaganja, ako je primjenjivo, kako je opisano za kontrole koje se provode istodobno s tekućim ispitivanim kemikalijama (vidjeti stavak 32.) ili za kontrole koje se provode istodobno s ispitivanim kemikalijama u krutom stanju (vidjeti stavak 33.), prije provedbe MTT testa (vidjeti stavak 35. i literaturu pod 34. i 35.). Jedan skup negativnih i pozitivnih kontrola dovoljan je za sve ispitivane kemikalije u istom agregatnom stanju (tekućine ili kemikalije u krutom stanju) uključene u isti ciklus.

Mjerenja vijabilnosti tkiva

35. MTT test standardizirana je kvantitativna metoda (16.) koja bi se trebala upotrebljavati za mjerenje vijabilnosti tkiva u okviru ove ispitne metode. Taj je test prikladan za trodimenzionalni model tkiva. MTT test provodi se neposredno nakon razdoblja inkubacije nakon izlaganja. Kod validiranih referentnih metoda uzorak modela tkiva RhCE stavlja se u 0,3 ml otopine MTT-a koncentracije 1 mg/ml na 180 ± 15 min u standardnim uvjetima kulture. Vijabilne stanice modela tkiva RhCE reduciraju vitalnu boju MTT u talog plavog MTT formazana. Nataloženi proizvod plavog MTT formazana zatim se ekstrahira iz tkiva upotrebom primjerenog volumena izopropanola (ili sličnog otapala) (34. i 35.). Tkiva koja se ispituju tekućim ispitivanim kemikalijama treba ekstrahirati i iz gornjeg i donjeg dijela tkiva, dok tkiva koja se ispituju kemikalijama u krutom stanju i obojenim tekućinama treba ekstrahirati samo iz donjeg dijela tkiva (kako bi se smanjila potencijalna kontaminacija ekstrakcijske otopine izopropanola ispitivanom kemikalijom koja je možda ostala u tkivu). Tkiva koja se ispituju tekućim ispitivanim kemikalijama koje nije jednostavno isprati isto se mogu ekstrahirati samo iz donjeg dijela tkiva. Tvari za negativnu i pozitivnu kontrolu koje se ispituju istodobno treba tretirati slično kao i ispitivane kemikalije. Ekstrahirani MTT formazan može se kvantificirati mjerenjem standardne apsorbancije (OD) na 570 nm upotrebom pojasa propuštanja do najviše ± 30 nm ili upotrebom postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavak 42. i literaturu pod 11. i 36.).
36. Optička svojstva ispitivanih kemikalija ili njihovo kemijsko djelovanje na MTT može utjecati na mjerenje MTT formazana, što dovodi do pogrešne procjene vijabilnosti tkiva. Ispitivane kemikalije mogu utjecati na mjerenje MTT formazana izravnom redukcijom MTT-a u plavi MTT formazan i/ili interferencijom s bojom ako ispitivana kemikalija apsorbira, prirodno ili zbog postupaka obrade, u istom rasponu optičke gustoće kao i MTT formazan (tj. približno 570 nm). Prije ispitivanja treba provesti prethodne provjere kako bi se omogućilo utvrđivanje potencijalnih tvari koje izravno reduciraju MTT i/ili kemikalija koje interferiraju s bojom te se trebaju upotrijebiti dodatne kontrole za otkrivanje i ispravljanje moguće interferencije tih ispitivanih kemikalija (vidjeti stavke od 37. do 41.). To je osobito važno kada se određena ispitivana kemikalija ne ispere u potpunosti s modela tkiva RhCE ili prodre u epitel koji nalikuje rožnici te je stoga prisutna u modelima tkiva RhCE pri provođenju MTT testa. Za ispitivane kemikalije koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan (prirodno ili nakon tretiranja), koje nisu kompatibilne s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) MTT formazana zbog prejake interferencije, tj. jake apsorbancije na 570 ± 30 nm, za mjerenje MTT formazana može se upotrijebiti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti stavke 41. i 42.) (11. i 36.). Podroban opis načina na koji se otkrivaju i ispravljaju izravna redukcija MTT-a i interferencije s bojilima dostupan je u standardnim operativnim postupcima za validirane referentne metode (34. i 35.). Ilustrativni dijagrami toka koji daju smjernice o tome kako utvrditi kemikalije koje izravno reduciraju MTT i/ili kemikalije koje interferiraju s bojom te kako postupati s njima u okviru VRM1 i VRM2 navedeni su u dodacima III. i IV.

37. Kako bi se utvrdila potencijalna interferencija ispitivanih kemikalija koje apsorbiraju svjetlost u istom rasponu kao i MTT formazan (prirodno ili nakon tretiranja) i odlučilo jesu li potrebne dodatne kontrole, ispitivana kemikalija dodaje se vodi i/ili izopropanolu te se inkubira na odgovarajuće vrijeme na sobnoj temperaturi (vidjeti Dodatak 2. te literaturu pod 34. i 35.). Ako ispitivana kemikalija u vodi i/ili izopropanolu apsorbira dovoljno svjetlosti u rasponu od 570 ± 20 nm za VRM1 (vidjeti Dodatak 3.) ili ako se miješanjem ispitivane kemikalije s vodom za VRM2 dobije obojena otopina (vidjeti Dodatak 4.), pretpostavlja se da ispitivana kemikalija utječe na mjerenje standardne apsorbancije (OD) MTT formazana i treba provesti daljnje kontrole bojila ili treba upotrijebiti postupak HPLC/UPLC spektrofotometrije, u kojem slučaju te kontrole nisu potrebne (vidjeti stavke 41. i 42., dodatke III. i IV. te literaturu pod 34. i 35.). Pri provedbi mjerenja standardne apsorbancije (OD), svaku interferirajuću ispitivanu kemikaliju treba primijeniti na najmanje dva ponovljena uzorka vijabilnog tkiva, koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju s medijem, a ne s otopinom MTT-a, kako bi se provela kontrola nespecifične boje u živim tkivima (NSC_{living}) (34. i 35.). Kontrolu NSC_{living} treba obavljati istodobno uz ispitivanje obojene ispitivane kemikalije, a u slučaju više ispitivanja sa svakim provedenim ispitivanjem (u svakom ciklusu) treba provesti neovisnu kontrolu NSC_{living} zbog svojstvene biološke varijabilnosti živih tkiva. Prava vijabilnost tkiva računa se kao: postotak vijabilnosti tkiva koji se dobiva iz živih tkiva izloženih interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranih otopinom MTT-a ($\%Vijabilnost_{\text{test}}$), umanjeno za postotak nespecifične boje dobiven sa živim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranim s medijem bez MTT-a, koji se provodi istodobno kao i test koji se ispravlja ($\%NSC_{\text{living}}$), tj. prava vijabilnost tkiva = $[\%Vijabilnost_{\text{test}}] - [\%NSC_{\text{living}}]$.
38. Kako bi se identificirale tvari koje izravno reduciraju MTT, svaku bi ispitivanu kemikaliju trebalo dodati u svježe pripremljenu otopinu MTT-a. Primjerena količina ispitivane kemikalije dodaje se otopini MTT-a i smjesa se inkubira približno tri sata u standardnim uvjetima kulture (vidjeti dodatke III. i IV.) (34. i 35.). Ako smjesa MTT-a koja sadržava ispitivanu kemikaliju (ili suspenziju za netopljive ispitivane kemikalije) postane plava/ljubičasta, pretpostavlja se da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT i treba se provesti daljnja funkcionalna provjera nevijabilnih modela tkiva RhCE, neovisno o upotrebi mjerenja standardne apsorbancije (OD) ili postupka HPLC/UPLC spektrofotometrije. U toj dodatnoj funkcionalnoj provjeri upotrebljavaju se mrtva tkiva kod kojih je prisutna samo preostala metabolička aktivnost, ali koja apsorbiraju i zadržavaju ispitivanu kemikaliju na sličan način kao i vijabilna tkiva. Mrtva tkiva za metodu VRM1 pripremaju se izlaganjem niskoj temperaturi („usmrćivanje zamrzavanjem”). Mrtva tkiva za metodu VRM2 pripremaju se produljenom inkubacijom (npr. najmanje 24 ± 1 h) u vodi, nakon čega slijedi skladištenje na niskoj temperaturi („usmrćivanje vodom”). Svaka ispitivana kemikalija koja reducira MTT primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva koji se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja kako bi se provela kontrola nespecifične redukcije MTT-a (NSMTT) (34. i 35.). Dovoljna je jedna kontrola NSMTT po ispitivanoj kemikaliji neovisno o broju provedenih neovisnih ispitivanja/ciklusa. Prava vijabilnost tkiva računa se kao: postotak vijabilnosti tkiva dobiven sa živim tkivima izloženima tvari koja reducira MTT ($\%Vijabilnost_{\text{test}}$), umanjen za postotak nespecifične redukcije MTT-a dobiven s mrtvim tkivima izloženima istoj tvari koja reducira MTT, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kao i test koji se ispravlja ($\%NSMTT$), tj. prava vijabilnost tkiva = $[\%Vijabilnost_{\text{test}}] - [\%NSMTT]$.
39. Za ispitivane kemikalije za koje se utvrdi da interferiraju s bojom (vidjeti stavak 37.) i izravno reduciraju MTT (vidjeti stavak 38.) bit će potreban i treći skup kontrola pri mjerenju standardne apsorbancije (OD) osim kontrola NSMTT i NSC_{living} opisanih u prethodnim stavcima. To je obično slučaj kod tamno obojenih ispitivanih kemikalija koje apsorbiraju svjetlost u rasponu od 570 ± 30 nm (npr. plave, ljubičaste ili crne kemikalije) jer njihova intrinzična boja sprečava procjenu njihove sposobnosti da izravno reduciraju MTT, kako je opisano u stavku 38. Zbog toga je automatski obvezna upotreba kontrola NSMTT, zajedno s kontrolama NSC_{living} . I živa i mrtva tkiva mogu apsorbirati i zadržati ispitivane kemikalije za koje se provode i kontrola NSMTT i kontrola NSC_{living} . Stoga se u tom slučaju kontrolom NSMTT može ispraviti ne samo potencijalna izravna redukcija MTT-a ispitivanom kemikalijom, već i interferencija s bojom koja je posljedica apsorpcije i zadržavanja ispitivane kemikalije u mrtvim tkivima. To bi moglo dovesti do dvostrukog ispravka za interferenciju s bojom jer se kontrolom NSC_{living} već ispravlja interferencija s bojom koja je posljedica apsorpcije i zadržavanja ispitivane kemikalije u živim tkivima. Kako bi se izbjegao mogući

dvostruki ispravak za interferenciju s bojom, treba provesti treću kontrolu za nespecifičnu boju u mrtvim tkivima (NSC_{killed}) (vidjeti dodatke III. i IV. te literaturu pod 34. i 35.). U toj dodatnoj kontroli ispitivana kemikalija primjenjuje se na najmanje dva ponovljena uzorka mrtvog tkiva, koja se podvrgavaju cijelom postupku ispitivanja, ali se u koraku inkubacije MTT-a inkubiraju s medijem, a ne s otopinom MTT-a. Dovoljna je jedna kontrola NSC_{killed} po ispitivanoj kemikaliji neovisno o broju provedenih neovisnih ispitivanja/ciklusa, ali treba je provoditi istodobno s kontrolom NSMTT i s istom šaržom tkiva. Prava vijabilnost tkiva računa se kao: postotak vijabilnosti tkiva dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji (%Vijabilnost_{test}), umanjeno za %NSMTT i %NSC_{living} te uvećano za postotak nespecifične boje dobiven s mrtvim tkivima izloženima interferirajućoj ispitivanoj kemikaliji i inkubiranim s medijem bez MTT-a, izračunano u odnosu na negativnu kontrolu koja se provodi istodobno kao i test koji se ispravlja (%NSC_{killed}), tj. prava vijabilnost tkiva = [%Vijabilnost_{test}] – [%NSMTT] – [%NSC_{living}] + [%NSC_{killed}].

40. Važno je napomenuti da nespecifična redukcija MTT-a i interferencije s nespecifičnim bojama mogu povećati optičku gustoću (kod mjerenja standardne apsorbancije) ekstrakta tkiva iznad raspona linearnosti spektrofotometra i da nespecifična redukcija MTT-a može povećati i površinu pika MTT formazana (kod mjerenja HPLC/UPLC spektrofotometrijom) ekstrakta tkiva iznad raspona linearnosti spektrofotometra. Na temelju toga važno je da svaki laboratorij prije početka ispitivanja ispitivanih kemikalija u regulatorne svrhe utvrdi raspon linearnosti optičke gustoće/površine pika svojeg spektrofotometra, npr. s MTT formazanom (CAS # 57360-69-7), komercijalno dostupnim kod npr. društva Sigma-Aldrich (Cat# M2003).
41. Mjerenje standardne apsorbancije spektrofotometrom primjereno je za procjenu kemikalija koje izravno reduciraju MTT i ispitivanih kemikalija koje interferiraju s bojom ako je uočena interferencija kod mjerenja MTT formazana prevelika (tj. vrijednosti optičke gustoće ekstrakata tkiva dobivenih s ispitivanom kemikalijom bez ispravaka za izravnu redukciju MTT-a i/ili interferencija s bojom unutar su linearnog raspona spektrofotometra). Ipak, rezultate za ispitivane kemikalije koji daju %NSMTT i/ili %NSC_{living} ≥ 60 % (VRM1 i VRM2 za protokol za tekućine) ili 50 % (VRM2 za protokol za kemikalije u krutom stanju) negativne kontrole trebalo bi oprezno tumačiti jer je to utvrđena granična vrijednost koja se u validiranim referentnim metodama upotrebljava za razlikovanje razvrstanih i nerazvrstanih kemikalija (vidjeti stavak 44.). Međutim, standardna apsorbancija ne može se mjeriti kada je interferencija s mjerenjem MTT formazana prevelika (tj. kada dovodi do neispravljenih vrijednosti optičke gustoće ispitivanih ekstrakata tkiva izvan linearnog raspona spektrofotometra). Obojene ispitivane kemikalije ili ispitivane kemikalije koje se oboje u dodiru s vodom ili izopropanolom koje preveliko interferiraju s mjerenjem standardne apsorbancije (OD) MTT formazana mogu se procijeniti primjenom HPLC/UPLC spektrofotometrije (vidjeti dodatke III. i IV.). Razlog je tome što sustav HPLC/UPLC omogućuje izdvajanje MTT formazana iz kemikalije prije njegove kvantifikacije (36.). Zato pri upotrebi HPLC/UPLC spektrofotometrije nikada nisu potrebne kontrole NSC_{living} i NSC_{killed}, neovisno o kemikaliji koja se ispituje. Kontrole NSMTT ipak treba upotrijebiti ako se sumnja u to da ispitivana kemikalija izravno reducira MTT (nakon postupka opisanog u stavku 38.). Kontrole NSMTT treba upotrijebiti i s ispitivanim kemikalijama koje imaju boju (intrinzičnu ili koja se javlja u vodi) koja sprečava procjenu njihove sposobnosti da izravno reduciraju MTT, kako je opisano u stavku 38. Ako se za mjerenje MTT formazana upotrebljava HPLC/UPLC spektrofotometrija, postotak vijabilnosti tkiva računa se kao postotak površine pika MTT formazana dobiven sa živim tkivima izloženima ispitivanoj kemikaliji u odnosu na pik MTT formazana dobiven s istodobnom negativnom kontrolom. Za ispitivane kemikalije koje mogu izravno reducirati MTT prava vijabilnost tkiva računa se kao: %Vijabilnost_{test} umanjeno za %NSMTT, kako je opisano u posljednjoj rečenici stavka 38. Naposljetku, treba napomenuti da se ispitnim metodama RhCE ne mogu procijeniti kemikalije koje izravno reduciraju MTT ili kemikalije koje izravno reduciraju MTT koje ujedno mogu interferirati s bojom, koje se zadržavaju u tkivima nakon tretiranja i reduciraju MTT toliko jako da dovode do optičke gustoće (upotrebom standardnog mjerenja optičke gustoće) ili površina pika (upotrebom UPLC/HPLC spektrofotometrije) ispitivanih ekstrakata tkiva koje su izvan raspona linearnosti spektrofotometra, iako se očekuje da će se one javljati samo u iznimno rijetkim slučajevima.

42. HPLC/UPLC spektrofotometrija može se upotrebljavati sa svim vrstama ispitivanih kemikalija (obojenima i neobojenima, koje reduciraju MTT i koje ga ne reduciraju) za mjerenje MTT formazana (11. i 36.). Zbog raznolikosti sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije nije izvedivo da svaki korisnik uspostavi identične uvjete sustava. Stoga bi kvalifikaciju sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije trebalo dokazati prije njegove upotrebe za kvantificiranje MTT formazana iz ekstrakata tkiva tako da sustav ispuni kriterije prihvatljivosti za skup standardnih parametara kvalifikacije u skladu s parametrima opisanim u smjernicama američke Uprave za hranu i lijekove o validaciji bioanalitičkih metoda namijenjenih industriji (36. i 38.). Ti ključni parametri i njihovi kriteriji prihvatljivosti prikazani su u Dodatku 5. Kada se ispune kriteriji prihvatljivosti definirani u Dodatku 5., smatra se da je sustav HPLC/UPLC spektrofotometrije kvalificiran i spreman za mjerenje MTT formazana u pokusnim uvjetima opisanim u ovoj ispitnoj metodi.

Kriteriji prihvatljivosti

43. Za svaki ciklus u kojem se upotrebljavaju šarže tkiva RhCE koje ispunjavaju kontrolu kvalitete (vidjeti stavak 30.), tkiva tretirana s tvari za negativnu kontrolu trebala bi imati optičku gustoću koja odražava kvalitetu tkiva za koja su poštovani koraci dopreme i preuzimanja te svi postupci protokola i koja ne bi smjela biti izvan prethodno utvrđenih granica opisanih u tablici 2. (vidjeti stavak 26.). Slično tome, tkiva tretirana s tvari za pozitivnu kontrolu, tj. metilacetatom, trebaju pokazivati srednju vijabilnost tkiva $< 50 \%$ u odnosu na negativnu kontrolu u metodi VRM1 s protokolom za tekućine ili kemikalije u krutom stanju i $\leq 30 \%$ (protokol za tekućine) ili $\leq 20 \%$ (protokol za kemikalije u krutom stanju) u odnosu na negativnu kontrolu u metodi VRM2, što odražava sposobnost tkiva da odgovore na nadražujuću ispitivanu kemikaliju u uvjetima ispitivane metode (34. i 35.). Varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva s ispitivanim kemikalijama i kontrolnim tvarima trebala bi biti unutar prihvaćenih granica (tj. razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od 20% odnosno standardna devijacija u tri ponovljena uzorka tkiva ne bi trebala biti veća od 18%). Ako je negativna ili pozitivna kontrola uključena u ciklus izvan prihvaćenih raspona, smatra se da ciklus ne ispunjava zahtjeve i treba ga ponoviti. Ako je varijabilnost između ponovljenih uzorka tkiva s ispitivanom kemikalijom izvan prihvaćenog raspona, mora se smatrati da test ne ispunjava zahtjeve i ispitivanu kemikaliju treba ponovno ispitati.

Tumačenje rezultata i model predviđanja

44. Vrijednosti optičke gustoće/površine pika dobivene s ponovljenim ekstraktima tkiva za svaku ispitivanu kemikaliju treba upotrebljavati za izračun srednjeg postotka vijabilnosti tkiva (srednja vrijednost među ponovljenim uzorcima tkiva) normaliziranog u odnosu na negativnu kontrolu, koja je određena kao 100% . Granična vrijednost postotka vijabilnosti tkiva za utvrđivanje ispitivanih kemikalija koje ne treba razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka (bez kategorije prema sustavu UN GHS i CLP-u) navedena je u tablici 4. Rezultate stoga treba tumačiti na sljedeći način:

- utvrđuje se da ispitivanu kemikaliju ne treba razvrstati i označiti u skladu sa sustavom UN GHS i CLP-om (bez kategorije) ako je srednji postotak vijabilnosti tkiva nakon izlaganja i inkubacije nakon izlaganja veći od ($>$) utvrđene granične vrijednosti postotka vijabilnosti tkiva, kako je prikazano u tablici 4. U tom slučaju nije potrebno daljnje ispitivanje drugim ispitnim metodama,
- ako je srednji postotak vijabilnosti tkiva nakon izlaganja te inkubacije nakon izlaganja manji od ili jednak ($\leq$) utvrđenoj graničnoj vrijednosti postotka vijabilnosti tkiva, predviđanje nije moguće, kako je prikazano u tablici 4. U tom će slučaju biti potrebno daljnje ispitivanje s drugim ispitnim metodama jer ispitne metode RhCE pokazuju određeni broj lažno pozitivnih rezultata (vidjeti stavke 14. i 15.) i ne razlikuju kategorije 1. i 2. prema sustavu UN GHS i CLP-u (vidjeti stavak 17.).

Tablica 4.

Modeli predviđanja u skladu s razvrstavanjem prema sustavu UN GHS i CLP-u

VRM	Bez kategorije	Predviđanje nije moguće
VRM 1 – EIT EpiOcular™ (za oba protokola)	Srednja vijabilnost tkiva > 60 %	Srednja vijabilnost tkiva ≤ 60 %
VRM 2 – EIT s HCE-om SkinEthic™ (za protokol za tekućine)	Srednja vijabilnost tkiva > 60 %	Srednja vijabilnost tkiva ≤ 60 %
VRM2 – EIT s HCE-om SkinEthic™ (za protokol za kemikalije u krutom stanju)	Srednja vijabilnost tkiva > 50 %	Srednja vijabilnost tkiva ≤ 50 %

45. Jedan test koji obuhvaća najmanje dva ponovljena uzorka tkiva trebao bi biti dovoljan za ispitivanu kemikaliju ako je rezultat nedvosmislen. Međutim, u slučajevima graničnih rezultata, kao što su neusklađena ponovljena mjerenja i/ili srednji postotak vijabilnosti tkiva od $60 \pm 5\%$ (VRM1 i VRM2 za protokol za tekućine) ili $50 \pm 5\%$ (VRM2 za protokol za kemikalije u krutom stanju), trebalo bi razmotriti drugi test, a i treći test u slučaju neusklađenih rezultata između prva dva testa.
46. Za specifične vrste smjesa mogu se razmotriti različite granične vrijednosti postotaka vijabilnosti tkiva prema kojima se razvrstane ispitivane kemikalije razlikuju od nerazvrstanih, ako je primjereno i obrazloženo, kako bi se povećala ukupna uspješnost ispitne metode za te vrste smjesa (vidjeti stavak 14.). Referentne kemikalije mogu biti korisne za procjenu potencijala nepoznate ispitivane kemikalije ili razreda proizvoda da uzrokuju tešku ozljedu oka/nadraživanje oka ili za procjenu relativne potencijalne okularne toksičnosti razvrstane kemikalije unutar specifičnog raspona pozitivnih odgovora.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Podaci

47. Podatke iz pojedinačnih ponovljenih tkiva u ciklusu (npr. podaci o vrijednosti optičke gustoće/površini pika MTT formazana i izračunanom postotku vijabilnosti tkiva za ispitivanu kemikaliju i kontrole te konačno predviđanje na temelju ispitne metode RhCE) treba navesti u obliku tablice za svaku ispitivanu kemikaliju, prema potrebi uključujući i podatke iz ponovljenih testova. Osim toga, treba navesti i srednji postotak vijabilnosti tkiva i razliku vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva (ako je $n = 2$ ponovljena uzorka tkiva) ili standardnu devijaciju (ako je $n \geq 3$ ponovljena uzorka tkiva) za svaku pojedinačnu ispitivanu kemikaliju i kontrolu. Za svaku ispitivanu kemikaliju treba navesti svaku uočenu interferenciju s mjerenjem MTT formazana koje ispitivana kemikalija uzrokuje izravnom redukcijom MTT-a i/ili interferencijom s bojom.

Izvješće o ispitivanju

48. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije.

Ispitivana kemikalija

Tvar s jednim sastojkom:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS registracijski broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- agregatno stanje, hlapljivost, pH-vrijednost, LogP, molekularna masa, kemijski razred i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva relevantna za provedbu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

Tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa:

- opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti gore), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti gore), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- agregatno stanje i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva relevantna za provedbu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni.

Tvari za pozitivnu i negativnu kontrolu

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS registracijski broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- agregatno stanje, hlapljivost, molekularna masa, kemijski razred i dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva relevantna za provedbu studije, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- ako je primjenjivo, obrazloženje upotrebe negativne kontrole koja nije ultračisti H₂O ili DPBS bez Ca²⁺/Mg²⁺,
- ako je primjenjivo, obrazloženje upotrebe pozitivne kontrole koja nije čisti metil-acetat,
- upućivanje na rezultate koji se odnose na prijašnje pozitivne i negativne kontrole i pokazuju primjerenost kriterija prihvatljivosti ciklusa.

Informacije o naručitelju i ustanovi koja provodi ispitivanje:

- naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja.
- *Upotrijebljeni model tkiva RhCE i protokol (uz obrazloženje odabira ako je primjenjivo)*

Uvjeti primjene ispitne metode:

- upotrijebljeni model tkiva RhCE, uključujući broj šarže,
- valna duljina i pojas propuštanja (ako je primjenjivo) koji se upotrebljavaju za kvantifikaciju MTT formazana te raspon linearnosti mjernog uređaja (npr. spektrofotometra),
- opis metode koja se upotrebljava za kvantifikaciju MTT formazana,
- opis upotrijebljenog sustava HPLC/UPLC spektrofotometrije, ako je primjenjivo,
- potpune popratne informacije o konkretnom modelu tkiva RhCE koji je korišten, uključujući njegove radne značajke. To bi, među ostalim, trebalo uključivati:
 - i. kontrolu kvalitete vijabilnosti (dobavljač);
 - ii. vijabilnost u uvjetima primjene ispitne metode (korisnik);
 - iii. kontrolu kvalitete funkcije barijere;
 - iv. morfologiju ako je dostupna;
 - v. obnovljivost i prediktivnu sposobnost;
 - vi. druge kontrole kvalitete (KK) modela tkiva RhCE ako su dostupne,
- upućivanje na prijašnje podatke za model tkiva RhCE. To bi, među ostalim, trebalo uključivati: prihvatljivost podataka o kontroli kvalitete s upućivanjem na prijašnje podatke o šarži,
- izjava o tome da je ustanova koja provodi ispitivanje dokazala osposobljenost za upotrebu ispitne metode prije rutinske upotrebe ispitivanjem kemikalija koje služe za dokazivanje osposobljenosti.

Kriteriji prihvatljivosti ciklusa i ispitivanja:

- srednje vrijednosti i rasponi prihvatljivosti pozitivnih i negativnih kontrola na temelju prijašnjih podataka,
- prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za pozitivne i negativne kontrole,
- prihvatljiva varijabilnost između ponovljenih uzoraka tkiva za ispitivanu kemikaliju.

Ispitni postupak:

- pojedinosti o upotrijebljenom ispitnom postupku,
- doze upotrijebljenih ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari,
- trajanja i temperature izlaganja, uranjanja nakon izlaganja i inkubacije nakon izlaganja (ako je primjenjivo),
- opis svih izmjena ispitnog postupka,

- oznake kontrola koje se koriste za tvari koje neposredno reduciraju MTT i/ili ispitivane kemikalije za bojenje, ako je primjenjivo,
- broj ponovljenih uzoraka tkiva upotrijebljenih po ispitivanoj kemikaliji i kontrolama (pozitivna kontrola, negativna kontrola i NSMTT, NSC_{living} i NSC_{killed} , ako je primjenjivo).

Rezultati

- tablični prikaz podataka za pojedinačne ispitivane kemikalije i kontrolne tvari za svaki ciklus (uključujući ponovljene pokuse ako je primjenjivo) i svako ponovljeno mjerenje, uključujući vrijednost optičke gustoće ili površinu pika MTT formazana, postotak vijabilnosti tkiva, srednji postotak vijabilnosti tkiva, razlike između ponovljenih uzoraka tkiva ili standardne devijacije te konačno predviđanje,
- ako je primjenjivo, rezultati kontrola upotrijebljenih za kemikalije koje neposredno reduciraju MTT i/ili obojenih ispitivanih kemikalija, uključujući vrijednost optičke gustoće ili površinu pika MTT formazana, %NSMTT, % NSC_{living} , % NSC_{killed} , razliku između ponovljenih uzoraka tkiva ili standardnu devijaciju, konačni točni postotak vijabilnosti tkiva i konačno predviđanje,
- rezultati dobiveni s ispitivanim kemikalijama i kontrolnim tvarima u odnosu na utvrđene kriterije prihvatljivosti za ciklus i ispitivanje,
- opis drugih uočenih učinaka, npr. ako obojena ispitivana kemikalija oboji tkiva.

Rasprava o rezultatima

Zaključak

LITERATURA

1. UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York i Ženeva. United Nations. Dostupno na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
2. Poglavlje B.5. ovog Priloga, Akutno nadraživanje/nagrizanje oka.
3. Poglavlje B.47. ovog Priloga, Metoda ispitivanja zamućenja i propusnosti goveđe rožnice za utvrđivanje i. kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka i ii. kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka.
4. Poglavlje B.48. ovog Priloga, Metoda ispitivanja na izoliranom pilećem oku za utvrđivanje i. kemikalija koje izazivaju tešku ozljedu oka i ii. kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka.
5. Poglavlje B.61. ovog Priloga, Metoda ispitivanja propuštanja fluoresceina za identifikaciju tvari nagrizajućih i jako nadražujućih za oči.
6. Poglavlje B.68. ovog Priloga, *In vitro* ispitna metoda s kratkim vremenom izlaganja za utvrđivanje: i. kemikalija koje induciraju tešku ozljedu oka i ii. kemikalija koje nije potrebno razvrstati s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka.
7. Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261.–266.

8. EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Dostupno na: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
9. EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 od 17. studenoga 2014.; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Dostupno na: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>.
10. Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S., Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43.–53.
11. Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S., Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55.–70.
12. EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 od 24. lipnja 2016.; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Dostupno na: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704>.
13. EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Rukopis u pripremi).
14. Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377.–390.
15. Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1.–9.
16. Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55.–63.
17. OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
18. OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

19. Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339.–364.
20. Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for *in vitro* toxicology. U: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, str. 147.–159.
21. Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619.–626.
22. Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476.–1488.
23. Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1.–18.
24. Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701.–723.
25. Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521.–547.
26. Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113.–126.
27. Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. U: *Advances in Modern Toxicology: Dermatotoxicology* Marzulli F.N. and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, str. 749.–815. Washington, DC, SAD: Hemisphere Publishing Corporation.
28. Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons* Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, str. 665.–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.
29. Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922.–936.

30. Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106.–117.
31. Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115.–130.
32. Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610.–2625.
33. Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41.–54.
34. EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Dostupno na: [<https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>].
35. SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Dostupno na: <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>.
36. Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741.–761.
37. Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101.–127.
38. US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Svibanj 2001. Dostupno na: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
39. OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitne metode i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitne metode i jedan od aspekata „relevantnosti”. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitne metode (18.).

Referentna kemikalija: kemikalija koja se primjenjuje kao standard za usporedbu s ispitivanom kemikalijom. Referentna kemikalija trebala bi imati sljedeća svojstva: i. dosljedne i pouzdane izvore za njezinu identifikaciju i karakterizaciju; ii. strukturnu, funkcionalnu i/ili kemijsku sličnost ili razred proizvoda sličan kemikalijama koje se ispituju; iii. poznata fizikalno-kemijska svojstva; iv. podatke kojima se dokazuju poznati učinci; i v. poznatu jakost u rasponu željenog odgovora.

Pristup odozdo prema gore: stupnjeviti pristup koji se primjenjuje za ispitivanu kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da joj nije potrebno razvrstavanje i označivanje s obzirom na nadraživanje oka ili tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija za koje nije potrebno razvrstavanje i označivanje (negativan ishod) u odnosu na druge kemikalije (pozitivan ishod).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

Podudarnost: vidjeti „Točnost”.

Rožnica: transparentni dio prednje strane očne jabučice kojim su prekrivene šarenica i zjenica i koji propušta svjetlost u unutrašnjost oka.

CV: koeficijent varijacije.

Dev.: odstupanje.

EIT: test nadraživanja oka.

EURL ECVAM: referentni laboratorij Europske unije za alternative ispitivanju na životinjama.

Nadraživanje oka: promjene na oku nastale kao rezultat primjene ispitivane kemikalije na prednju površinu oka, koje su potpuno reverzibilne u roku od 21 dana nakon primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „reverzibilni učinci na oko” i „kategorija 2. sustava UN GHS/CLP-a”.

ET₅₀: vrijeme izlaganja potrebno za smanjenje vijabilnosti tkiva za 50 % nakon primjene referentne kemikalije u određenoj, fiksnoj koncentraciji.

Udio lažno negativnih rezultata: udio svih pozitivnih tvari koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao negativne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Stopa lažno pozitivnih rezultata: udio svih negativnih tvari koje su ispitnom metodom pogrešno identificirane kao pozitivne. Jedan je od pokazatelja uspješnosti ispitne metode.

Opasnost: inherentno svojstvo nekog agensa ili stanje koje može uzrokovati štetne učinke kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

HCE: epitel ljudske rožnice SkinEthic™.

HPLC: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

IC₅₀: koncentracija pri kojoj referentna kemikalija smanjuje vijabilnost tkiva za 50 % nakon fiksnog vremena izlaganja (npr. 30 minuta tretiranja SDS-om).

Beskonačna doza: količina ispitivane kemikalije primijenjena na model tkiva RhCE koja je veća od količine potrebne da bi se potpuno i ravnomjerno pokrila površina epitela.

Ireverzibilni učinci na oko: vidjeti „tešku ozljedu oka”.

LLOQ: donja granica kvantifikacije.

LogP: logaritam podjelnog koeficijenta oktanol-voda.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % (w/w) ili većoj te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil plavo tetrazolijev bromid.

Negativna kontrola: uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da ne inducira pozitivan odgovor u ispitnom sustavu. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima te se upotrebljava kako bi se utvrdila 100-postotna vijabilnost tkiva.

Nerazvrstano: kemikalije koje nisu razvrstane s obzirom na nadraživanje oka (kategorija 2. sustava UN GHS/CLP-a, kategorija 2.A ili 2.B sustava UN GHS) ili tešku ozljedu oka (kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a). Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmom „bez kategorije prema sustavu UN GHS/CLP-u”.

NSC_{killed}: nespecifična boja u mrtvim tkivima.

NSC_{living}: nespecifična boja u živim tkivima.

NSMTT: nespecifična redukcija MTT-a.

OD: optička gustoća.

Zahtjevi izvedbe: zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi koja se smatrala znanstveno valjanom i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Oni uključuju: i. ključne elemente ispitne metode; ii. minimalni popis referentnih kemikalija odabranih između kemikalija koje se koriste za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode; i iii. slične razine točnosti i pouzdanosti, utemeljene na rezultatima dobivenim za validiranu ispitnu metodu, koje se prilikom ocjenjivanja trebaju dokazati predloženom ispitnom metodom koristeći minimalni popis referentnih kemikalija (18.).

Pozitivna kontrola: uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da inducira pozitivan odgovor u ispitnom sustavu. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima tretiranim ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživnog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitne metode (18.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitna metoda može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (18.).

Zamjensko ispitivanje: ispitivanje koje zamjenjuje rutinsko i prihvaćeno ispitivanje za određivanje opasnosti i/ili procjenu rizika, za koje je utvrđeno da osigurava istovjetnu ili bolju zaštitu zdravlja ljudi, zdravlja životinja ili okoliša u odnosu na prihvaćeno ispitivanje u svim mogućim okolnostima ispitivanja i za sve kemikalije (18.).

Obnovljivost: podudarnost rezultata dobivenih ponovljenim ispitivanjem iste ispitivane kemikalije uz primjenu istog ispitnog protokola (vidjeti „pouzdanost”) (18.).

Reverzibilni učinci na oko: vidjeti „nadraživanje oka”.

RhCE: rekonstruirani epitel koji nalikuje ljudskoj rožnici.

Ciklus: ciklus se sastoji od jedne ispitivane kemikalije ili više njih koje se ispituju istodobno s negativnom i pozitivnom kontrolom.

SD: standardna devijacija.

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih ispitivanih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (18.).

Teška ozljeda oka: oštećenje očnog tkiva ili ozbiljno fizičko pogoršanje vida izazvano primjenom ispitivane tvari na prednju površinu oka, koje nije u potpunosti reverzibilno unutar 21 dana od primjene. Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmovima „ireverzibilni učinci na oko” i „kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a”.

Standardni operativni postupci (SOP): formalni, pisani postupci kojima se detaljno opisuje kako treba provoditi specifične rutinske laboratorijske operacije i operacije specifične za test. Obvezni su na temelju dobre laboratorijske prakse.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih ispitivanih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitne metode koja daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitne metode (18.).

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnome stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Test: jedna ispitivana kemikalija koja se istodobno ispituje na najmanje dva ponovljena uzorka tkiva kako je utvrđeno u odgovarajućem SOP-u.

Vijabilnost tkiva: parametar za mjerenje ukupne aktivnosti populacije stanica u rekonstruiranom tkivu u obliku njihove sposobnosti da reduciraju vitalnu boju MTT, što ovisno o krajnjoj točki koja se mjeri i planu ispitivanja korelira s ukupnim brojem i/ili vitalnošću živih stanica.

Pristup odozgo prema dolje: stupnjeviti pristup koji se primjenjuje za kemikaliju u pogledu koje postoji sumnja da inducira tešku ozljedu oka, a koji počinje utvrđivanjem kemikalija koje induciraju tešku ozljedu oka (pozitivan ishod) u odnosu na druge kemikalije (negativan ishod).

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Strategija višerazinskog ispitivanja: strategija stupnjevito ispitivanja u kojoj se ispitne metode upotrebljavaju sekvencijski. Sve postojeće informacije o ispitivanoj kemikaliji preispituju se na svakoj razini, pri čemu se prije prelaska na sljedeću razinu strategije primjenjuje postupak analize snage dokaza kako bi se odredilo je li na raspolaganju dovoljno informacija za donošenje odluke o razvrstavanju tvari s obzirom na opasnost. Ako se na temelju postojećih podataka ispitivanoj kemikaliji može pripisati potencijal/jakost opasnog djelovanja, daljnje ispitivanje nije potrebno (18.).

ULOQ: gornja granica kvantifikacije.

Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti i opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (1.).

Kategorija 1. sustava UN GHS/CLP-a: vidjeti „tešku ozljedu oka”.

Kategorija 2. sustava UN GHS/CLP-a: vidjeti „nadraživanje oka”.

Bez kategorije prema sustavu UN GHS i CLP-u: kemikalije koje ne ispunjavaju zahtjeve za razvrstavanje u kategoriju 1. ili 2. sustava UN GHS/CLP-a (ili kategoriju 2.A ili 2.B sustava UN GHS). Pojam je međusobno zamjenjiv s pojmom „nerazvrstano”.

UPLC: tekućinska kromatografija iznimno visoke djelotvornosti.

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Valjana ispitna metoda: ispitna metoda za koju se smatra da je dovoljno relevantna i pouzdana za određenu svrhu te koja se temelji na znanstveno utemeljenim načelima. Ispitna metoda nije nikada valjana u apsolutnom smislu nego samo u odnosu na određenu svrhu (18.).

Validirana ispitna metoda: ispitna metoda za koju su provedena validacijska istraživanja za utvrđivanje relevantnosti (uključujući točnost) i pouzdanosti za specifičnu namjenu. Važno je napomenuti da validirana ispitna metoda možda neće biti u dovoljnoj mjeri uspješna s obzirom na točnost i pouzdanost da bi je se moglo smatrati prihvatljivom za predloženu namjenu (18.).

VRM: validirana referentna metoda.

VRM1: test nadraživanja oka EpiOcular™ naziva se validiranom referentnom metodom 1.

VRM2: test nadraživanja oka s epitelom ljudske rožnice SkinEthic™ naziva se validiranom referentnom metodom 2.

Analiza snage dokaza: proces razmatranja prednosti i slabosti različitih informacija u donošenju i dokazivanju zaključka o potencijalu opasnosti ispitivane tvari.

Dodatak 2.

GLAVNI ELEMENTI TESTOVA RHCE VALIDIRANIH ZA UTVRĐIVANJE KEMIKA LIJA KOJE NIJE POTREBNO RAZVRSTATI I OZNAČITI S OBZIROM NA NADRAŽIVANJE OKA ILI TEŠKU OZLIJEDU OKA

Elementi testa	EIT EpiOcular™ (VRM 1)		EIT s HCE-om SkinEthic™ (VRM 2)	
	Tekućine (koje se mogu pipetirati na temperaturi od 37 ± 1 °C ili nižoj 15 min)	Kemikalije u krutom stanju (ne mogu se pipetirati)	Tekućine i viskozne kemikalije (mogu se pipetirati)	Kemikalije u krutom stanju (ne mogu se pipetirati)
Površina modela	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²	0,5 cm ²
Broj ponovljenih uzoraka tkiva	Najmanje dva	Najmanje dva	Najmanje dva	Najmanje dva
Prethodna provjera za interferenciju s bojom	50 µl + 1 ml H ₂ O 60 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 % (bezbojne ispitivane kemikalije) ili 50 µl + 2 ml izopropanola miješano 2–3 h na sobnoj temp. (obojene ispitivane kemikalije) → ako je OD ispitivane kemikalije pri 570 ± 20 nm, nakon što se oduzme OD za izopropanol ili vodu, > 0,08 (što odgovara približno 5 % srednjeg OD-a negativne kontrole), trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	50 mg + 1 ml H ₂ O 60 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 % (bezbojne ispitivane kemikalije) i/ili 50 mg + 2 ml izopropanola miješano 2–3 h na sobnoj temp. (obojene i bezbojne ispitivane kemikalije) → ako je OD ispitivane kemikalije pri 570 ± 20 nm, nakon što se oduzme OD za izopropanol ili vodu, > 0,08 (što odgovara približno 5 % srednjeg OD-a negativne kontrole), trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	10 µl + 90 µl H ₂ O miješano 30 ± 2 min na sobnoj temperaturi (18–28 °C) → ako je ispitivana kemikalija obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu	10 mg + 90 µl H ₂ O miješano 30 ± 2 min na sobnoj temperaturi → ako je ispitivana kemikalija obojena, trebalo bi provesti prilagođene kontrole na živom tkivu

Elementi testa	EIT EpiOcular™ (VRM 1)	EIT s HCE-om SkinEthic™ (VRM 2)
Prethodna provjera izravne redukcije MTT-a	otopina 50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml tijekom 180 ± 15 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, relativna vlažnost ≥ 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem zamrzavanjem (kao negativna kontrola upotrebljava se 50 µl sterilne deionizirane vode u otopini MTT-a)	otopina 30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml tijekom 180 ± 15 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, relativna vlažnost ≥ 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem vodom (kao negativna kontrola upotrebljava se 30 µl sterilne deionizirane vode u otopini MTT-a) 30 mg + 300 µl MTT otopina 1 mg/ml tijekom 180 ± 15 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, relativna vlažnost ≥ 95 % → ako otopina postane plava/ljubičasta, treba provesti prilagođene kontrole usmrćivanjem vodom (kao negativna kontrola upotrebljava se 30 µl sterilne deionizirane vode u otopini MTT-a)
Prethodna obrada	20 µl DPBS-a bez Ca²⁺/Mg²⁺ tijekom 30 ± 2 min na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, relativna vlažnost ≥ 95 %, zaštićeno od svjetla	–
Doze za tretiranje i primjena	50 µl (83,3 µl/cm²)	10 µl DPBS-a bez Ca²⁺/Mg²⁺ + 30 ± 2 µl (60 µl/cm²) Za viskozne kemikalije upotrijebiti najlonsku mrežu 30 µl DPBS-a bez Ca²⁺/Mg²⁺ + 30 ± 2 mg (60 mg/cm²)
Vrijeme i temperatura izloženosti	30 min (± 2 min) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, relativna vlažnost ≥ 95 %	30 min (± 2 min) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, relativna vlažnost ≥ 95 % 4 sata (± 0,1 sat) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, relativna vlažnost ≥ 95 %

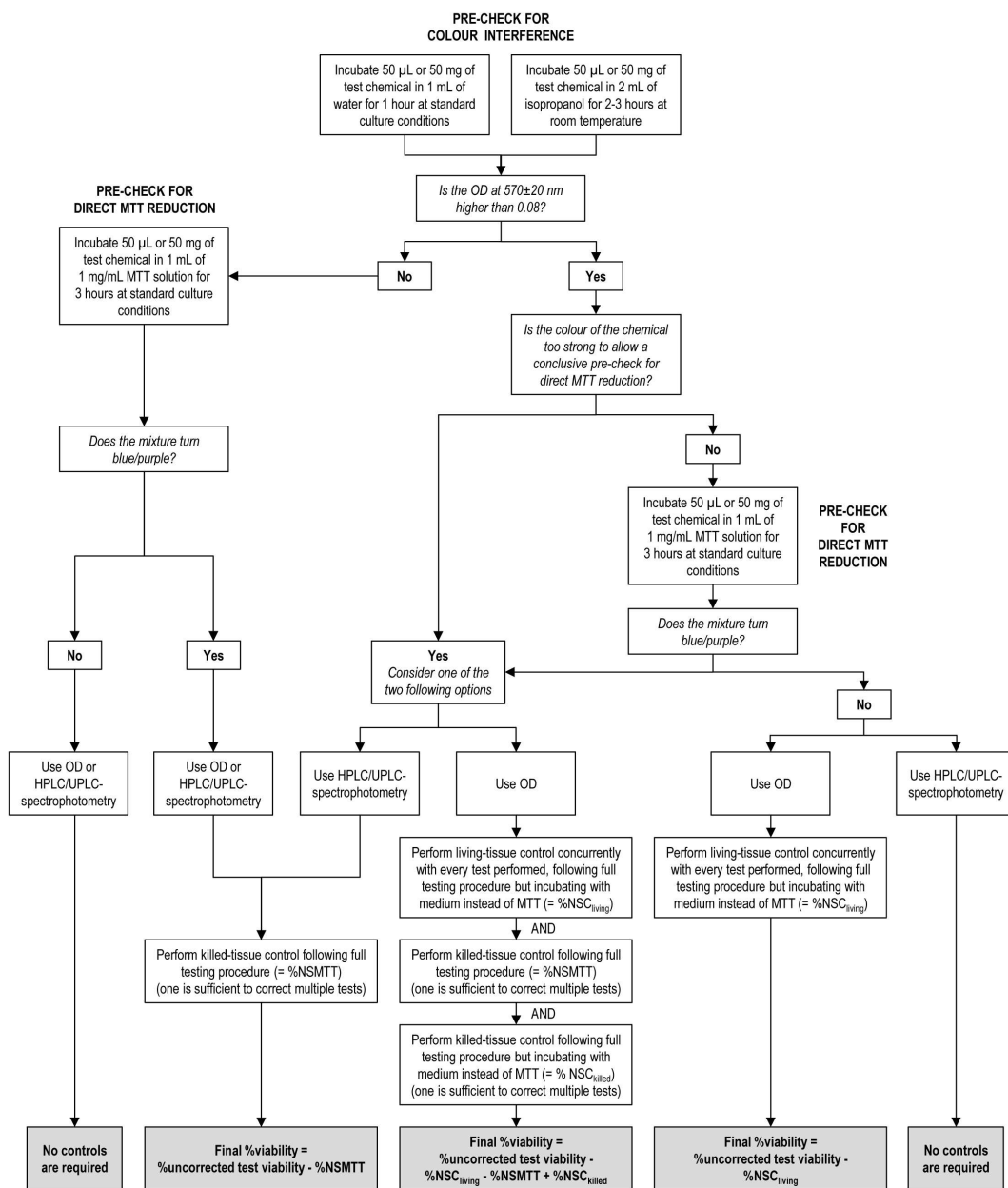
Elementi testa	EIT EpiOcular™ (VRM 1)		EIT s HCE-om SkinEthic™ (VRM 2)	
Ispiranje na sobnoj temperaturi	3 puta u 100 ml DPBS-a bez $\text{Ca}_{2+}/\text{Mg}_{2+}$	3 puta u 100 ml DPBS-a bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	20 ml DPBS-a bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	25 ml DPBS-a bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
Uranjanje nakon izlaganja	12 min (± 2 min) na sobnoj temp. u mediju za uzgoj kulture	25 min (± 2 min) na sobnoj temp. u mediju za uzgoj kulture	30 min (± 2 min) na 37 °C, 5 % CO_2 , relativna vlažnost od 95 % u mediju za uzgoj kulture	30 min (± 2 min) na sobnoj temp. u mediju za uzgoj kulture
Inkubacija nakon izlaganja	120 min (± 15 min) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2 , relativna vlažnost ≥ 95 %	18 h ($\pm 0,25$ h) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2 , relativna vlažnost ≥ 95 %	nema	18 h ($\pm 0,5$ h) u mediju za uzgoj kulture na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2 , relativna vlažnost ≥ 95 %
Negativna kontrola	50 μl H_2O Ispitano istodobno	50 μl H_2O Ispitano istodobno	30 ± 2 μl DPBS-a bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ Ispitano istodobno	30 ± 2 μl DPBS-a bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ Ispitano istodobno
Pozitivna kontrola	50 μl metilacetata Ispitano istodobno	50 μl metilacetata Ispitano istodobno	30 ± 2 μl metilacetata Ispitano istodobno	30 ± 2 μl metilacetata Ispitano istodobno

Elementi testa	EIT EpiOcular™ (VRM 1)		EIT s HCE-om SkinEthic™ (VRM 2)	
Otopina MTT-a	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Vrijeme i temperatura inkubacije MTT-a	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %	180 min (± 15 min) na 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , relativna vlažnost ≥ 95 %
Ekstrakcijsko otapalo	2 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka bušenjem tkiva)	2 ml izopropanola (ekstrakcija s dna umetka bušenjem tkiva)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija s vrha i dna umetka)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija s dna umetka)
Vrijeme i temperatura ekstrakcije	2–3 h uz protresanje (~ 120 o/min) na sobnoj temp. ili preko noći na $4-10$ °C	2–3 h uz protresanje (~ 120 o/min) na sobnoj temp. ili preko noći na $4-10$ °C	4 h uz protresanje (~ 120 o/min) na sobnoj temp. ili barem preko noći bez protresanja na $4-10$ °C	Najmanje 2 h uz protresanje (~ 120 o/min) na sobnoj temp.
Očitavanje optičke gustoće	570 nm (550–590 nm) bez referentnog filtra	570 nm (550–590 nm) bez referentnog filtra	570 nm (540–600 nm) bez referentnog filtra	570 nm (540–600 nm) bez referentnog filtra
Kontrola kvalitete tkiva	Tretiranje sa 100 µl 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100 12,2 min $\leq$ ET ₅₀ $\leq$ 37,5 min	Tretiranje sa 100 µl 0,3-postotnog (v/v) Tritona X-100 12,2 min $\leq$ ET ₅₀ $\leq$ 37,5 min	tretiranje SDS-om 30 min (50 µl) 1,0 mg/ml $\leq$ IC ₅₀ $\leq$ 3,5 mg/ml	tretiranje SDS-om 30 min (50 µl) 1,0 mg/ml $\leq$ IC ₅₀ $\leq$ 3,2 mg/ml

Elementi testa	EIT EpiOcular™ (VRM 1)	EIT s HCE-om SkinEthic™ (VRM 2)
Kriteriji prihvatljivosti	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi biti $> 0,8$ i $< 2,5$. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli na 30 min, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti < 50 %. 3. Razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od 20 %.	1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi biti $> 1,0$ i $\leq 2,5$. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli na 30 min, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti ≤ 30 %. 3. Razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od 20 %.
		1. Srednja optička gustoća ponovljenih uzoraka tkiva tretiranih negativnom kontrolom trebala bi biti $> 1,0$ i $\leq 2,5$. 2. Srednja vijabilnost ponovljenih uzoraka tkiva izloženih pozitivnoj kontroli na četiri sata, izražena kao postotak negativne kontrole, trebala bi biti ≤ 20 %. 3. Razlika u vijabilnosti između dva ponovljena uzorka tkiva trebala bi biti manja od 20 %.

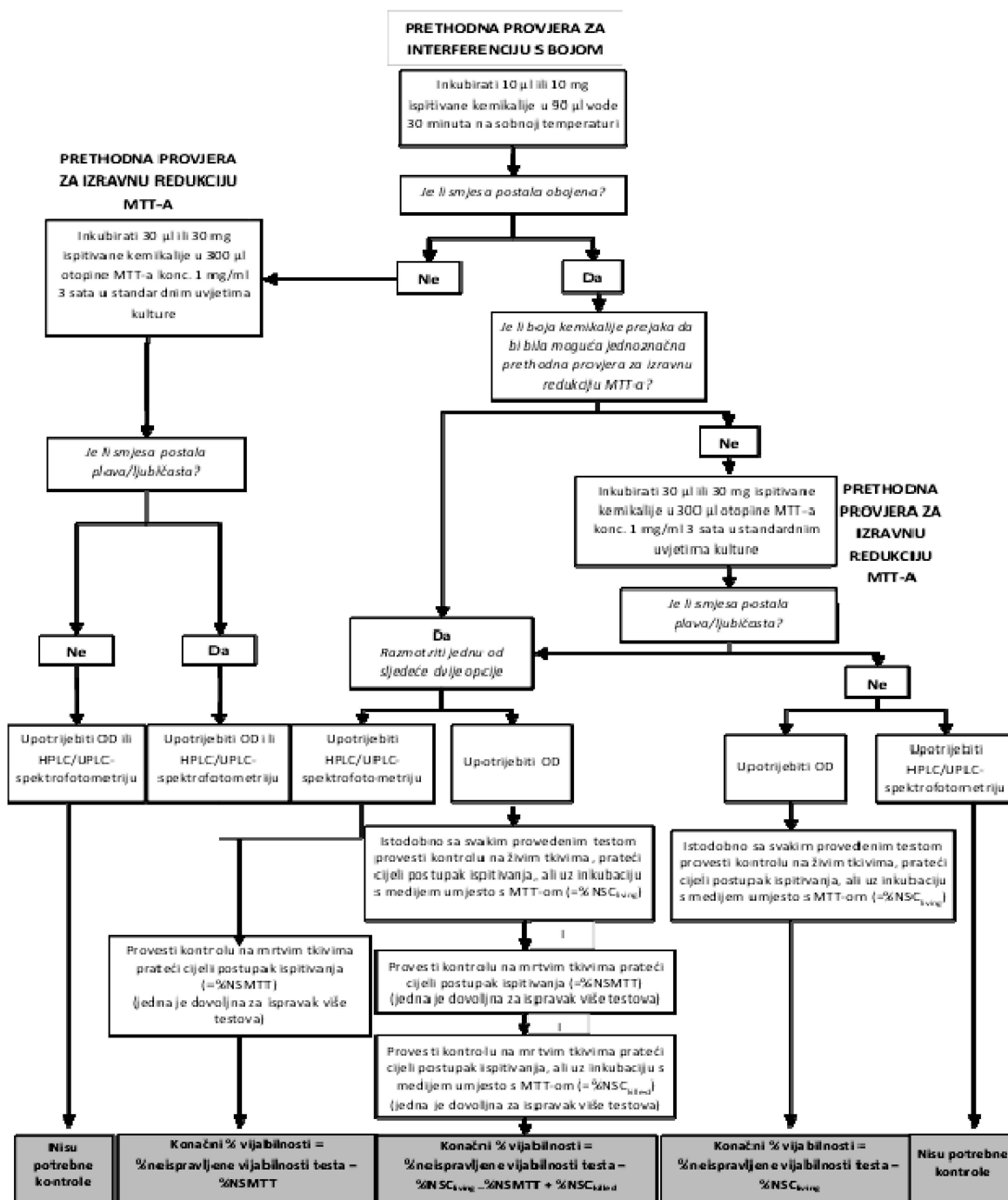
Dodatak 3.

ILUSTRATIVNI DIJAGRAM TOKA KOJI DAJE SMJERNICE O TOME KAKO UTVRDITI KEMIKALIJE KOJE IZRAVNO REDUCIRAJU MTT I/ILI KEMIKALIJE KOJE INTERFERIRAJU S BOJOM TE KAKO S NJIMA POSTUPATI, NA TEMELJU STANDARDNIH OPERATIVNIH POSTUPAKA ZA VRM1



Dodatak 4.

ILUSTRATIVNI DIJAGRAM TOKA KOJI DAJE SMJERNICE O TOME KAKO UTVRDITI KEMIČALIJE KOJE IZRAVNO REDUCIRAJU MTT I/ILI KEMIČALIJE KOJE INTERFERIRAJU S BOJOM TE KAKO S NJIMA POSTUPATI, NA TEMELJU STANDARDNIH OPERATIVNIH POSTUPAKA ZA VRM2



Dodatak 5.

KLJUČNI PARAMETRI I KRITERIJI PRIHVATLJIVOSTI ZA KVALIFIKACIJU SUSTAVA HPLC/UPLC SPEKTROFOTOMETRIJE ZA MJERENJE MTT FORMAZANA EKSTRAHIRANOG IZ MODELA TKIVA RHCE

Parametar	Protokol izveden iz smjernica Uprave za hranu i lijekove (FDA) (36. i 38.)	Kriteriji prihvatljivosti
Selektivnost	Analiza izopropanola, slijepe probe na živom tkivu (ekstrakt izopropanola iz modela živih tkiva RhCE bez ikakve obrade), slijepe probe na mrtvom tkivu (ekstrakt izopropanola iz modela mrtvih tkiva RhCE bez ikakve obrade) i boje (npr. metilensko plavilo)	$\text{Površina}_{\text{interference}} \leq 20 \%$ $\text{površine}_{\text{LLOQ}}^{(1)}$
Preciznost	Kontrole kvalitete (tj. MTT formazan pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml i 160 µg/ml) u izopropanolu (n = 5)	$\text{CV} \leq 15 \%$ ili $\leq 20 \%$ za LLOQ
Točnost	Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	$\% \text{Dev} \leq 15 \%$ ili $\leq 20 \%$ za LLOQ
Učinak matrice	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 5)	$85 \% \leq \% \text{ učinka matrice} \leq 115 \%$
Prijenos	Analiza izopropanola nakon standardnog ULOQ ⁽²⁾	$\text{Površina}_{\text{interference}} \leq 20 \%$ $\text{površine}_{\text{LLOQ}}$
Obnovljivost (u danu)	3 neovisne kalibracijske krivulje (na temelju šest uzastopnih razrjeđivanja 1/3 MTT formazana u izopropanolu, počevši s ULOQ-om, tj. 200 µg/ml) Kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 5)	Kalibracijske krivulje: $\% \text{Dev} \leq 15 \%$ ili $\leq 20 \%$ za LLOQ Kontrole kvalitete: $\% \text{Dev} \leq 15 \%$ i $\text{CV} \leq 15 \%$
Obnovljivost (među danima)	Prvi dan: 1 kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Drugi dan: 1 kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3) Treći dan: 1 kalibracijska krivulja i kontrole kvalitete u izopropanolu (n = 3)	
Kratkoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhCE	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon 24 sata skladištenja na sobnoj temperaturi	
Dugoročna stabilnost MTT formazana u ekstraktu tkiva RhCE, ako je potrebno	Kontrole kvalitete u slijepoj probi na živom tkivu (n = 3) analizirane na dan pripreme i nakon nekoliko dana skladištenja na $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$	$\% \text{Dev} \leq 15 \%$

⁽¹⁾ LLOQ: donja granica kvantifikacije, definirana tako da obuhvaća vijabilnost tkiva od 1 do 2 %, tj. 0,8 µg/ml.

⁽²⁾ ULOQ: gornja granica kvantifikacije, definirana tako da bude barem dva puta veća od najviše očekivane koncentracije MTT formazana u ekstraktima izopropanola iz negativnih kontrola (~ 70 µg/ml u validiranoj referentnoj metodi), tj. 200 µg/ml.

B.70. IN VITRO TESTOVI LJUDSKOG REKOMBINANTNOG ESTROGENSKOG RECEPTORA (hrER) ZA OTKRIVANJE KEMIKALIJA S AFINITETOM VEZIVANJA NA ESTROGENSKI RECEPTOR**OPĆI UVOD****OECD-ova smjernica za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti**

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 493 (TG) (2015.). Smjernica za ispitivanje 493 jest smjernica za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti (PBTG), u kojoj se opisuje metodologija za *in vitro* testove ljudske rekombinante za otkrivanje tvari s afinitetom vezivanja na estrogenske receptore (testovi vezivanja na hrER). Sastoji se od dva mehanicistički i funkcionalno slična testa za identifikaciju kemikalija koje se vežu na estrogenske receptore (tj. ERα) i trebala bi olakšati razvoj novih sličnih ili izmijenjenih testova u skladu s načelima za validaciju utvrđenima u Vodiču OECD-a o validaciji i međunarodnom prihvaćanju novih ili ažuriranih ispitnih metoda za procjenu opasnosti (1.). Potpuno validirane referentne ispitne metode (Dodatak 2. i Dodatak 3.) koje čine osnovu ove smjernice za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti uključuju:

— Freyberger-Wilsonov (FW) *in vitro* test vezivanja na estrogenske receptore (ER) upotrebom cijelog ljudskog rekombinantnog receptora ERα (2.), i

— *in vitro* test vezivanja na estrogenski receptor upotrebom ljudskog rekombinantnog proteina domene vezivanja liganda koji je razvio CERl (Institut za procjenu i istraživanje kemikalija) (2.).

Dostupni su zahtjevi izvedbe (PS) (3.) za lakši razvoj i validaciju sličnih ispitnih metoda za istu krajnju točku opasnosti te omogućivanje pravovremene izmjene PBTG-a 493 kako bi se novi slični testovi mogli dodati u ažurirani PBTG. Međutim, slični testovi dodat će se samo nakon što ih OECD pregleda i složi se da su ispunjeni zahtjevi izvedbe. Testovi uključeni u Smjernicu za ispitivanje 493 mogu se upotrebljavati neselektivno za ispunjavanje zahtjeva zemalja članica OECD-a u pogledu rezultata ispitivanja vezivanja na estrogenske receptore, uz ostvarivanje koristi od OECD-ova uzajamnog prihvaćanja podataka.

Kontekst i načela testova uključenih u ovu ispitnu metodu

2. OECD je 1998. pokrenuo aktivnost visokog prioriteta u cilju revizije postojećih i razvoja novih smjernica za ispitivanje za probir i ispitivanje potencijalnih endokrino disruptivnih kemikalija. OECD-ov konceptualni okvir (CF) za ispitivanje i procjenu potencijalnih endokrino disruptivnih kemikalija revidiran je 2012. Izvorni i revidirani konceptualni okvir uključeni su kao prilozi Vodiču o standardiziranim smjernicama za ispitivanje za ocjenu kemikalija u pogledu endokrine disrupcije (4.). Konceptualni okvir sastoji se od pet razina, a svaka razina odgovara različitoj razini biološke složenosti. Testovi vezivanja na estrogenske receptore opisani u ovoj ispitnoj metodi testovi su 2. razine, koja uključuje „*in vitro* testove koji pružaju podatke o odabranim endokrinim mehanizmima/putovima”. Ova je ispitna metoda namijenjena za *in vitro* testove vezivanja na receptor osmišljene za identifikaciju liganda na ljudski estrogenski receptor alfa (ERα).
3. Relevantnost *in vitro* testa vezivanja na estrogenske receptore za biološke funkcije jasno je dokazana. Testovi vezivanja na estrogenski receptor osmišljeni su za utvrđivanje kemikalija koje potencijalno mogu ometati hormonski put estrogena te su se u posljednja dva desetljeća često upotrebljavali za opisivanje distribucije estrogenskog receptora u tkivu i za utvrđivanje agonista/antagonista estrogenskog receptora. Tim se testovima oponaša interakcija liganda i receptora koja čini početni korak estrogenskog signalnog puta i ključna je za reproduktivnu funkciju svih kralježnjaka.

4. Interakcija estrogena i estrogenog receptora može utjecati na transkripciju gena koje kontrolira estrogen i inducirati negenomske učinke, a to može dovesti do indukcije ili inhibicije staničnih procesa, među ostalim i onih koji su potrebni za proliferaciju stanica, uobičajeni fetalni razvoj i reproduktivnu funkciju (5., 6. i 7.). Poremećaj uobičajenih estrogenih sustava potencijalno može uzrokovati štetne učinke na uobičajeni razvoj (ontogeneza), reproduktivno zdravlje i integritet reproduktivnog sustava. Neispravno signaliziranje estrogenog receptora može dovesti do učinaka kao što su povećani rizik od karcinoma koji ovise o hormonima, smanjenje plodnosti te promjene fetalnog rasta i razvoja (8.).
5. *In vitro* testovi vezivanja temelje se na izravnoj interakciji tvari sa specifičnim mjestom vezivanja liganda na receptor koje regulira transkripciju gena. Ključni element testa vezivanja na ljudski rekombinantni estrogeni receptor alfa (hrERα) mjeri sposobnost radioaktivno obilježenog liganda ($[^3\text{H}]17\beta$ -estradiol) da se veže na estrogeni receptor u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije (tj. konkurenata). Ispitivane kemikalije koje imaju velik afinitet za estrogeni receptor natječu se s radioaktivno obilježenim ligandom pri nižoj koncentraciji u odnosu na kemikalije s manjim afinitetom za taj receptor. Ovaj se test sastoji od dva glavna elementa: pokusa vezivanja do zasićenja kako bi se opisali parametri interakcije receptora i liganda i evidentirala specifičnost estrogenog receptora, nakon čega slijedi pokus konkurentskog vezivanja u kojem se ispitivana kemikalija i radioaktivno obilježeni ligand natječu u vezivanju na estrogeni receptor.
6. Validacijske studije CERi-jevog i FW testa vezivanja pokazale su njihovu relevantnost i pouzdanost za predviđenu svrhu (2.).
7. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj ispitnoj metodi opisuju se u Dodatku 1.

Područje primjene testova vezivanja na receptore i ograničenja povezana s njima

8. Ovi se testovi predlažu u svrhu probira i utvrđivanja prioriteta, ali u njima se mogu dobiti i informacije za početni molekularni događaj (MIE) koje se mogu upotrijebiti u pristupu snage dokaza. Testovima se ispituje kemijsko vezivanje na domenu vezivanja liganda receptora ERα u *in vitro* sustavu. Stoga rezultate ne bi trebalo izravno ekstrapolirati na signalizaciju kompleksa i regulaciju netaknutog endokrinog sustava *in vivo*.
9. Vezivanje prirodnog liganda, 17β -estradiola, početni je korak u nizu molekularnih događaja koji aktivira transkripciju ciljnih gena i naposljetku kulminira fiziološkom promjenom (9.). Stoga se vezivanje na domenu vezivanja liganda receptora ERα smatra jednim od ključnih mehanizama endokrine disrupcije posredovane estrogenim receptorom, iako postoje i drugi mehanizmi preko kojih može doći do endokrine disrupcije, uključujući: i. interakcije s mjestima na receptoru ERα koja nisu džep za vezivanje liganda; ii. interakcije s ostalim receptorima relevantnima za signaliziranje estrogena, receptorom ERβ i estrogenim receptorom spregnutim s G-proteinima, ostalim receptorima i enzimskim sustavima u endokrinom sustavu; iii. sintezu hormona; iv. metaboličku aktivaciju i/ili inaktivaciju hormona; v. distribuciju hormona u ciljna tkiva i vi. uklanjanje hormona iz tijela. Nijedan test u okviru ove ispitne metode ne bavi se tim načinima djelovanja.

10. Ovom ispitnom metodom ispituje se sposobnost tvari da se vežu na ljudski receptor ER α i njome se ne razlikuju agonisti i antagonisti receptora ER α . Test se ne bavi daljnjim događajima kao što su transkripcija gena ili fiziološke promjene. Budući da su se u validaciji upotrebljavale samo pojedinačne tvari s jednim sastojkom, nije se razmatrala primjenjivost za ispitivanje smjese. Unatoč tomu, testovi su u teoriji primjenjivi i za ispitivanje tvari s više sastojaka i smjese. Prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese.
11. Sustavi receptora koji ne sadržavaju stanice nemaju intrinzičnu metaboličku sposobnost i nisu validirani u kombinaciji s metaboličkim enzimskim sustavima. Međutim, metabolička aktivnost možda se može uključiti u plan istraživanja, ali za to bi bila potrebna dodatna validacija.
12. Kemikalije koje mogu denaturirati protein (tj. protein receptora), kao što su površinski aktivne tvari ili kemikalije koje mogu promijeniti pH-vrijednost testnog pufera, ne mogu se ispitati ili se mogu ispitati samo pri koncentracijama kod kojih nema tih interakcija. Osim toga, raspon koncentracija koji se može ispitati u testovima za ispitivanu kemikaliju ograničen je njezinom topljivošću u testnom puferu.
13. U informativne svrhe u tablici 1. navedeni su rezultati ispitivanja za 24 tvari koje su ispitane u oba potpuno validirana testa opisana u ovoj ispitnoj metodi. Na temelju objavljenih izvješća, od tih tvari 17 ih je razvrstano kao kemikalije koje se vežu na estrogenski receptor, a šest kao kemikalije koje se ne vežu, uključujući *in vitro* testove za transkripcijsku aktivaciju estrogenskog receptora i/ili uterotrofni test (9., 10., 11., 12., 13., 14. i 15.). S obzirom na podatke sažete u tablici 1., postojala je gotovo 100-postotna podudarnost između dva testa u vezi s razvrstavanjem svih tvari do 10^{-4} M i svaka je tvar točno razvrstana kao kemikalija koja se veže ili ne veže na estrogenske receptore. Dodatne informacije o ovoj skupini tvari i o dodatnim tvarima koje su ispitane u testovima vezivanja na estrogenske receptore tijekom validacijskih studija navedene su u zahtjevima izvedbe za test vezivanja na hrER (3.), Dodatak 2. (tablice 1., 2. i 3.).

Tablica 1.

Razvrstavanje tvari kao kemikalija koje se vežu ili ne vežu na estrogenske receptore kada se ispituju u FW i CERL-jevom testu vezivanja na hrER

	Naziv tvari	CAS br.	Predviđeni odgovor	FW test		CERL-jev test		Kemijski razred prema MESH-u	Razred proizvoda
				Raspon konc. (M)	Razvrstavanje	Raspon konc. (M)	Razvrstavanje		
1	17 β -estradiol	50-28-2	Kemikalija koja se veže	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Kemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
2	Noretinodrel	68-23-5	Kemikalija koja se veže	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Kemikalija koja se veže	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Kemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
3	Noretindron	68-22-4	Kemikalija koja se veže	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Kemikalija koja se veže	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Kemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
4	Di-n-butiril-ftalat	84-74-2	Kemikalija koja se ne veže (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže (**) ()	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže (**) ()	Ugljikovodik (ciklički), ester	Plastifikator, kemijski međuprodukt
5	DES	56-53-1	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
6	17 α -etinilestradiol	57-63-6	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
7	Mezo-heksestrol	84-16-2	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
8	Genistein	446-72-0	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (heterocikl.), flavonoid	Prirodni proizvod
9	Ekvuol	531-95-3	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Metabolit fitoestrogena	Prirodni proizvod
10	Butil paraben (n-butil-4-hidroksi-benzoat)	94-26-8	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Paraben	Konzervans

	Naziv tvari	CAS br.	Predviđeni odgovor	FW test		CERL-jev test		Kemijски razred prema MESH-u	Razred proizvoda
				Raspon konc. (M)	Razvrstavanje	Raspon konc. (M)	Razvrstavanje		
11	Nonilfenol (smjesa)	84852-15-3	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Alkilfenol	Međuspoj
12	o,p'-DDT	789-02-6	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Organoklor	Insekticid
13	Kortikosteron	50-22-6	Kemikalija koja se ne veže (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže	Steroid	Prirodni proizvod
14	Zearalenon	17924-92-4	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (heterocikl.), lakton	Prirodni proizvod
15	Tamoksifen	10540-29-1	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
16	5 α -dihidrotestosteron	521-18-6	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Steroid, nefenolni	Prirodni proizvod
17	Bisfenol A	80-05-7	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Fenol	Kemijски međuprodukt
18	4-n-heptilfenol	1987-50-4	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Daje dvosmi-slen odgovor (a)	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Alkilfenol	Međuprodukt
19	Kepon (klordekon)	143-50-0	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Ugljikovodik (halogenirani)	Pesticid
20	Benz(a)antracen	56-55-3	Kemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se ne veže (b)	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se ne veže (b)	Aromatični ugljikovodik	Međuprodukt
21	Enterolakton	78473-71-9	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se veže	Fitoestrogen	Prirodni proizvod
22	Progesteron	57-83-0	Kemikalija koja se ne veže (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže	Steroid	Prirodni proizvod

	Naziv tvari	CAS br.	Predviđeni odgovor	FW test		CER1-jev test		Kemijski razred prema MESH-u	Razred proizvoda
				Raspon konc. (M)	Razvrstavanje	Raspon konc. (M)	Razvrstavanje		
23	Oktil-trietoksisilan	2943-75-1	Kemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kemikalija koja se ne veže	Silan	Modifikator površine
24	Atrazin	1912-24-9	Kemikalija koja se ne veže (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Kemikalija koja se ne veže	Heterociklički spoj	Herbicid

(*) Granica topljivosti $< 1 \times 10^{-4}$ M.

(**) Upotreba i razvrstavanje di-n-butil-ftalata (DBP) kao kemikalije koja se ne veže temeljili su se na ispitivanju do 10^{-4} M jer je u nekim laboratorijima tijekom predvalidacijskih studija uočeno da tvar nije topljiva pri 10^{-3} M (npr. zamućenje).

(*) Tijekom validacijske studije di-n-butil-ftalat (DBP) ispitivao se kao kodirana ispitivana tvar pri koncentracijama do 10^{-3} M. U tim su uvjetima neki laboratoriji uočili smanjenje vezivanja radioaktivno obilježenog liganda pri najvišoj koncentraciji (10^{-3} M) i/ili nejasno prilagođenu krivulju. U tim je ciklusima DBP razvrstan kao „kemikalija koja daje dvosmislen odgovor” ili kao „kemikalija koja se veže” u tri laboratorija od njih pet koji su upotrebljavali CER1-jev test i u pet laboratorija od njih šest koji su upotrebljavali FW test (vidjeti literaturu pod 2., odjeljke IV.B.3.a,b i VI.A).

(*) Razvrstavanje nije bilo u skladu s predviđenim razvrstavanjem. Razvrstavanje 4-n-heptilfenola kao „kemikalije koja daje dvosmislen odgovor” ili kao „kemikalije koja se ne veže” u tri laboratorija od njih pet dovelo je do prosječnog razvrstavanja kao kemikalije koja daje dvosmislen odgovor. Temeljitim pregledom otkriveno je da su uzrok tome ograničenja topljivosti kemikalije koja su spriječila nastanak cijele krivulje vezivanja.

(b) Tijekom validacijske studije benz(a)antracen reklasificiran je kao kemikalija koja se ne veže (tj. negativan je) na temelju objavljene literature koja pokazuje da *in vitro* estrogena aktivnost navedena za tu tvar (16) prvenstveno ovisi o njezinoj metaboličkoj aktivaciji (17)(18). Enzimska metabolička aktivacija tvari ne bi se očekivala u testovima vezivanja na hrER koji ne sadržavaju stanice, kao što je slučaj u ovoj validacijskoj studiji između laboratorija. Stoga je tu tvar ispravno razvrstati kao kemikaliju koja se ne veže ako se upotrebljava u pokusnim uvjetima za FW i CER1-jev test.

SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER

Ključne sastavnice testa

14. Ova se ispitna metoda primjenjuje na testove u kojima se upotrebljava estrogenski receptor i primjereno snažan ligand na receptor koji se može upotrijebiti kao marker/obilježivač za test i koji se može istisnuti s povećavajućim koncentracijama ispitivane kemikalije. Testovi vezivanja sadržavaju sljedeće dvije glavne sastavnice: 1. vezivanje do zasićenja i 2. konkurentsko vezivanje. Test vezivanja do zasićenja upotrebljava se za potvrdu specifičnosti i aktivnosti pripreme receptora, dok se pokus konkurentskog vezivanja upotrebljava za procjenu sposobnosti ispitivane kemikalije da se veže na receptor hrER.

Kontrole

15. Treba opisati osnovu za predloženi istodobni referentni estrogen i kontrole. Istodobne kontrole (otapalo (nosač), pozitivne kontrole (kemikalija koja se veže na estrogenski receptor; snažan i slab afinitet), negativne kontrole (kemikalija koja se ne veže)), prema potrebi, znak su da test djeluje u ispitnim uvjetima i osnova su za usporedbe između pokusa; obično su dio kriterija prihvatljivosti za određeni pokus (1.). Na jednoj ploči tijekom svakog ciklusa treba upotrijebiti cijelu krivulju koncentracija referentnog estrogena i kontrola (tj. kemikalije koja se slabo veže i koja se ne veže). Sve ostale ploče trebaju sadržavati: 1. visoku (približno potpuno istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i kemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; 2. kontrolu s otapalom i nespecifično vezivanje, svako u tri ponavljanja.

Standardni postupci kontrole kvalitete

16. Treba provesti standardne postupke kontrole kvalitete kako je opisano za svaki test da bi se osigurala stabilnost aktivnih receptora, točne koncentracije kemikalija i održavanja granica tolerancije kroz više ponavljanja i zadržala sposobnost pružanja očekivanih odgovora vezivanja na estrogenske receptore tijekom vremena.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

17. Prije ispitivanja nepoznatih kemikalija primjenom bilo kojeg od testova u okviru ove ispitne metode, svaki laboratorij treba dokazati osposobljenost za primjenu testa provođenjem testova zasićenja kako bi se potvrdile specifičnost i aktivnost pripravlja estrogenskog receptora te testova konkurentskog vezivanja s referentnim estrogenom i kontrolama (kemikalije koje se slabo vežu i koje se ne vežu). Laboratorij treba uspostaviti bazu prijašnjih podataka s rezultatima za referentni estrogen i kontrole nastale u 3–5 neovisnih pokusa provedenih na različite dane. Ti će pokusi biti osnova za referentni estrogen i prijašnje kontrole za laboratorij te će se upotrebljavati kao djelomična ocjena prihvatljivosti testa za buduće cikluse.
18. Osjetljivost ispitnog sustava potvrdit će se i ispitivanjem tvari za dokazivanje osposobljenosti navedenih u tablici 2. Popis tvari za dokazivanje osposobljenosti podskup je referentnih tvari koje su navedene u zahtjevima izvedbe za testove vezivanja na estrogenske receptore (3.). Te su tvari komercijalno dostupne, čine razrede kemikalija koji se obično povezuju s aktivnošću vezivanja na estrogenski receptor, pokazuju primjeren raspon jakosti koji se očekuje za kemikalije koje se vežu (tj. slabe do jake) i koje se ne vežu na estrogenski receptor (tj. negativne). Ispitane koncentracije svake tvari za dokazivanje osposobljenosti trebaju obuhvaćati raspon naveden u tablici 2. Za svaku tvar treba provesti najmanje tri pokusa i rezultati trebaju biti u skladu s očekivanom aktivnošću kemikalije. Svaki pokus treba provesti neovisno (tj. sa svježim razrjeđivanjima receptora, kemikalija i reagensa), s tri ponavljanja za svaku koncentraciju. Osposobljenost se dokazuje točnim razvrstavanjem (pozitivno/negativno) svake tvari za dokazivanje osposobljenosti. Pri učenju testova svaki tehničar treba provesti ispitivanje osposobljenosti.

Tablica 2.

Popis kontrola i tvari za dokazivanje osposobljenosti za testove konkurentskog vezivanja na hrER ⁽¹⁾

Br.	Naziv tvari	CAS br. ⁽²⁾	Predviđeni odgovor ⁽³⁾ ⁽⁴⁾	Raspon ispitne koncentracije (M)	Kemijski razred prema MeSH-u ⁽⁵⁾	Razred proizvoda ⁽⁶⁾
Kontrole (referentni estrogen, kemikalija koja se slabo veže, kemikalija koja se ne veže)						
1	17β-estradiol	50-28-2	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
2	Noretinodrel (ili) noretindron	68-23-5 (ili) 68-22-4	Kemikalija koja se veže	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-6}$	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
3	Oktil-trietoksisilan	2943-75-1	Kemikalija koja se ne veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Silan	Modifikator površine
Tvari za dokazivanje osposobljenosti ⁽⁶⁾						
4	Dietilstilbestrol	56-53-1	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Ugljikovodik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
5	17α-etinilestradiol	57-63-6	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
6	Mezo-heksestrol	84-16-2	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Ugljikovodik (ciklički), fenol	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
7	Tamoksifen	10540-29-1	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Ugljikovodik (ciklički)	Farmaceutski proizvod, veterinarski proizvod
8	Genistein	446-72-0	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Heterociklički spoj, flavonoid	Prirodni proizvod

Br.	Naziv tvari	CAS br. ⁽²⁾	Predviđeni odgovor ⁽³⁾ ⁽⁴⁾	Raspon ispitne koncentracije ^(M)	Kemijski razred prema MeSH-u ⁽⁵⁾	Razred proizvoda ⁽⁶⁾
9	Bisfenol A	80-05-7	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Fenol	Kemijski međuprodukt
10	Zearalenon	17924-92-4	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Heterociklički spoj, lakton	Prirodni proizvod
11	Butil paraben	94-26-8	Kemikalija koja se veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Karbonsilna kiselina, fenol	Konzervans
12	Atrazin	1912-24-9	Kemikalija koja se ne veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Heterociklički spoj	Herbicid
13	Di-n-butil-ftalat (DBP) ⁽⁷⁾	84-74-2	Kemikalija koja se ne veže ⁽⁸⁾	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Ugljikovodik (ciklički), ester	Plastifikator, kemijski međuprodukt vod
14	Kortikosteron	50-22-6	Kemikalija koja se ne veže	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	Steroid	Prirodni proizvod

⁽¹⁾ Ako tvar za dokazivanje osposobljenosti više nije komercijalno dostupna, može se upotrijebiti tvar koja je razvrstana na isti način u pogledu vezivanja na estrogenske receptore, usporedive je jakosti te je iz istog kemijskog razreda.

⁽²⁾ Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima.

⁽³⁾ Razvrstavanje kao kemikalija koja se veže na ERα ili se ne veže na njega tijekom validacijske studije za CERL-jev i FW test vezivanja na hrER (2).

⁽⁴⁾ Aktivnost vezivanja na estrogenske receptore temeljila se na ICCVAM-ovu Osnovnom dokumentu za preispitivanje (BRD) za testove vezivanja estrogenskog receptora i transakcije (9.) te empirijskim podacima i drugim informacijama dobivenima iz studija na koje se upućuje i pregledane (10., 11., 12., 13., 14. i 15.).

⁽⁵⁾ Tvari su raspoređene u jedan kemijski razred ili njih više primjenom oznaka medicinskog nazivlja američke Nacionalne medicinske knjižnice (MeSH) – međunarodno priznate standardne sheme razvrstavanja (dostupno na: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽⁶⁾ Tvari su raspoređene u jedan razred proizvoda ili njih više primjenom baze podataka o opasnim tvarima američke Nacionalne medicinske knjižnice (dostupno na: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDb>).

⁽⁷⁾ DBP se može upotrebljavati kao zamjenska kontrolna kemikalija koja se ne veže, s najvećom koncentracijom od 10^{-4} M.

⁽⁸⁾ Granica topljivosti za tu tvar iznosi 10^{-4} M. Upotreba i razvrstavanje di-n-butil-ftalata (DBP) kao kemikalije koja se ne veže temelje se na ispitivanju do 10^{-4} M jer je u nekim laboratorijima tijekom predvalidacijskih studija uočeno da tvar nije topljiva pri 10^{-3} M (npr. zamućenje).

Ispitivanje topljivosti i utvrđivanje raspona koncentracija za ispitivane kemikalije

19. Treba provesti preliminarno ispitivanje kako bi se utvrdila granica topljivosti za svaku ispitivanu kemikaliju i utvrdio primjereni raspon koncentracija za upotrebu u testu. Granicu topljivosti svake ispitivane kemikalije prvo treba utvrditi u otapalu i zatim potvrditi u uvjetima testa. Konačna koncentracija ispitana u testu ne bi trebala biti veća od 1 mM. Ispitivanje za utvrđivanje raspona sastoji se od kontrole s otapalom i osam log-serijskih razrjeđivanja, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM ili manje, na temelju granice topljivosti) i uočene prisutnosti zamućenja ili taloga. Koncentracije u drugom i trećem pokusu po potrebi treba prilagoditi kako bi se bolje opisala krivulja koncentracija – odgovor.

Kriteriji prihvatljivosti ciklusa ispitivanja

20. Prihvaćanje ili odbijanje ciklusa ispitivanja temelji se na procjeni rezultata dobivenih za referentni estrogen i kontrolu koji se koriste za svaki pokus. Prvo, kod ploče 1 cijele krivulje koncentracija referentne kontrole iz svakog pokusa trebaju zadovoljiti mjerila uspješnosti s pomoću parametara prilagođene krivulje (npr. IC_{50} i Hillov nagib) na temelju rezultata navedenih za odgovarajuće protokole za CERI-jev i FW test (dodaci 2. i 3.) i prijašnjih kontrolnih podataka laboratorija koji provodi test. Sve kontrole (referentni estrogen, kemikalija koja se slabo veže i kemikalija koja se ne veže) treba točno razvrstati za svaki pokus. Kontrole na svim kasnijim pločama zatim treba procijeniti u pogledu dosljednosti s pločom 1. Treba upotrijebiti dovoljan raspon koncentracija ispitivane kemikalije kako bi se jasno utvrdio vrh krivulje konkurentskog vezivanja. Varijabilnost među ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije te među tri neovisna ciklusa treba biti razumna i znanstveno opravdana. Sposobnost dosljedne provedbe testa treba dokazati razvojem i održavanjem baze prijašnjih podataka za referentni estrogen i kontrole. Kao mjera obnovljivosti unutar jednog laboratorija mogu se koristiti standardne devijacije (SD) ili koeficijenti varijacije (CV) za srednje vrijednosti parametara prilagođavanja krivulja referentnog estrogena i kontrolne kemikalije koja se slabo veže. Pri pregledu rezultata kontrole na ploči iz svakog ciklusa te za svaku ispitivanu kemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu.

Osim toga, treba ispuniti sljedeća načela u pogledu kriterija prihvatljivosti:

- podaci bi trebali biti dovoljni za kvantitativnu procjenu vezivanja na estrogenske receptore,
- ispitane koncentracije trebale bi biti unutar područja topljivosti ispitivane kemikalije.

Analiza podataka

21. Utvrđeni postupak analize podataka o vezivanju do zasićenja i konkurentskom vezivanju treba ispunjavati ključna načela za opis interakcija receptora i liganda. Podaci o vezivanju do zasićenja obično se analiziraju upotrebom modela nelinearne regresije kojim se uzimaju u obzir ukupno i nespecifično vezivanje. Pri utvrđivanju vrijednosti B_{max} i K_d možda će biti potreban ispravak potrošnje liganada (npr. Swillens, 1995. (19.)). Podaci iz testova konkurentskog vezivanja obično se transformiraju (npr. postotak specifičnog vezivanja i koncentracija ispitivane kemikalije ($\log M$)). Procjene za $\log (IC_{50})$ za svaku ispitivanu kemikaliju treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krivulje kako bi se prilagodila Hillova jednadžba s četiri parametra. Nakon početne analize treba izvršiti pregled parametara prilagođene krivulje i izvršiti vizualni pregled mjere u kojoj podaci o vezivanju odgovaraju izrađenoj krivulji konkurentskog vezivanja. U nekim slučajevima može biti potrebna dodatna analiza kako bi se dobila najbolje prilagođena krivulja (npr. ograničavanje vrha i/ili dna krivulje, upotreba pravila od 10 %; vidjeti Dodatak 4. i literaturu pod 2. (odjeljak III.A.2.)).
22. Ispunjavanje kriterija prihvatljivosti (stavak 20.) znači da sustav testa pravilno funkcionira, ali time se ne osigurava da će svaki pojedinačni test dati točne podatke. Ponavljanje točnih rezultata prvog testa najbolji je znak toga da su dobiveni točni podaci.

Opći kriteriji za tumačenje podataka

23. Trenutačno ne postoji općeprihvaćena metoda za tumačenje podataka o vezivanju na estrogenske receptore. Međutim, i kvalitativne (npr. kemikalija koja se veže/ne veže) i/ili kvantitativne (npr. IC_{50} , relativni afinitet vezivanja (RBA) itd.) procjene aktivnosti posredovane hrER-om trebaju se temeljiti na empirijskim podacima i valjanoj znanstvenoj prosudbi.

Izvješće o ispitivanju

24. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Test:

- korišteni test.

Kontrolna/referentna/ispitivana kemikalija:

- izvor, broj serije, rok uporabe, ako su dostupni,
- stabilnost ispitivane kemikalije, ako je poznata,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu ako su poznate,
- prema potrebi, mjerenja pH-vrijednosti, osmolalnosti i taloga u mediju za uzgoj kulture kojem je dodana ispitivana kemikalija.

Tvar s jednim sastojkom:

- fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,
- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.

Tvari s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Otapalo/nosač:

- karakterizacija (priroda, dobavljač i serija),
- obrazloženje za odabir otapala/nosača,
- topljivost i stabilnost ispitivane kemikalije u otapalu/nosaču, ako su poznate.

Receptori:

- izvor receptora (dobavljač, kataloški broj, serija, vrste receptora, koncentracija aktivnih receptora koju je naveo dobavljač, potvrda dobavljača),

- opis receptora (uključujući rezultate vezivanja do zasićenja): K_d , B_{max} ,
- skladištenje receptora,
- radioaktivno obilježeni ligand,
- dobavljač, kataloški broj, serija, specifična aktivnost.

Ispitni uvjeti:

- ograničenja topljivosti u uvjetima testa,
- sastav pufera za vezivanje,
- koncentracija receptora,
- koncentracija obilježivača (tj. radioaktivno obilježenog liganda),
- koncentracije ispitivane kemikalije,
- postotak nosača u konačnom testu,
- temperatura i vrijeme inkubacije,
- metoda odvajanja vezanih/slobodnih tvari,
- pozitivne i negativne kontrole/referentne tvari,
- kriteriji na temelju kojih se test smatra pozitivnim, negativnim ili dvosmislenim.

Provjera prihvatljivosti:

- stvarne vrijednosti IC_{50} i vrijednosti Hillova nagiba za istodobne pozitivne kontrole/referentne tvari.

Rezultati:

- neobrađeni podaci i podaci o vezanim/slobodnim tvarima,
- ako je primjereno, provjera radi potvrde denaturiranja,
- ako postoji, najniža učinkovita koncentracija (LEC),
- vrijednosti RBA i/ili IC_{50} , ako je primjereno,
- odnos koncentracije i odgovora, ako je moguće,
- statističke analize, ako postoje, i mjera pogreške i pouzdanosti (npr. SEM, SD, CV interval 95-postotne pouzdanosti) te opis načina na koji se došlo do tih vrijednosti.

Rasprava o rezultatima:

— primjena pravila od 10 %.

Zaključak

LITERATURA

1. OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 34), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
3. OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
4. OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 150), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
5. Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, *Climacteric*, 5 Suppl 2: str. 20.–6.
6. Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer.*, 16(4): str. 1073.–89.
7. Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): str. 63.–6.
8. Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, *Endo Rev* 30(4):293.–342.
9. ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
10. ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
11. ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
12. Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225.–231.

13. OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
14. Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. str. 1.–188.
15. Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, *Toxicol. Letters*, 146: 111.–120.
16. Kummer V; Maskova, J; Zrally, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Letters*, 180: 213.–221.
17. Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58.–67.
18. Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34: 835.–848.
19. Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6):1197.–1203.

Dodatak 1.

DEFINICIJE I KRATICE

Pravilo od 10 %: opcija da se iz analize isključe podatkovne točke kod kojih je srednja vrijednost ponovljenih uzoraka za postotak specifično vezanog [³H]17β-estradiola za 10 % ili više iznad srednje vrijednosti uočene pri nižoj koncentraciji (vidjeti Dodatak 4.).

Kriteriji prihvatljivosti: minimalne norme za provedbu eksperimentalnih kontrola i referentnih normi. Da bi se pokus smatrao valjanim, trebali bi biti ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti.

Točnost (podudarnost): stupanj podudarnosti između rezultata testa i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti testa i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda testa (1.).

CF: OECD-ov konceptualni okvir za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

CV: koeficijent varijacije.

E2: 17β-estradiol.

ED: endokrina disrupcija.

hERα: ljudski estrogenski receptor alfa.

ER: estrogenski receptor.

Estrogeno djelovanje: sposobnost kemikalije da oponaša 17β-estradiol u pogledu sposobnosti da se veže na estrogenske receptore. Ovom se ispitnom metodom može otkriti vezivanje na receptor hERα.

IC₅₀: pola najveće učinkovite koncentracije inhibitorne ispitivane kemikalije.

ICCVAM: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (Međuagencijski koordinacijski odbor za validaciju alternativnih metoda).

Obnovljivost između laboratorija: mjera u kojoj različiti kvalificirani laboratoriji mogu dobiti kvalitativno i kvantitativno slične rezultate primjenom istog protokola i ispitivanjem istih tvari. Obnovljivost između više laboratorija utvrđuje se tijekom predvalidacijskih i validacijskih procesa te pokazuje mjeru u kojoj se test može uspješno prenositi među laboratorijima, a poznata je i kao interlaboratorijska obnovljivost (1.).

Obnovljivost unutar jednog laboratorija: utvrđivanje mjere u kojoj kvalificirane osobe u istom laboratoriju mogu uspješno ponoviti rezultate primjenom specifičnog protokola u različito vrijeme. Poznata je i kao intralaboratorijska obnovljivost (1.).

LEC: najniža učinkovita koncentracija jest najniža koncentracija ispitivane kemikalije koja dovodi do odgovora (tj. najniža koncentracija ispitivane kemikalije pri kojoj je multiplikacijski faktor indukcije statistički različit od istodobne kontrole s nosačem).

I ja također test: kolokvijalni izraz za test koji je strukturno i funkcionalno sličan validiranoj i prihvaćenoj referentnoj ispitnoj metodi. Izraz se često koristi u istom značenju kao slična ispitna metoda.

PBTG: smjernica za ispitivanje koja se temelji na uspješnosti.

Zahtjevi izvedbe: zahtjevi koji se temelje na validiranoj ispitnoj metodi i pružaju temelj za ocjenjivanje usporedivosti predložene, funkcionalno i mehanicistički slične, ispitne metode. Oni obuhvaćaju: 1. ključne sastavnice testa; 2. minimalni popis referentnih kemikalija odabranih između kemikalija koje se koriste za dokazivanje prihvatljive učinkovitosti validirane ispitne metode, i 3. slične razine točnosti i pouzdanosti, utemeljene na rezultatima dobivenim za validiranu ispitnu metodu, koje se prilikom ocjenjivanja trebaju dokazati predloženom ispitnom metodom koristeći minimalni popis referentnih kemikalija (1.).

Tvari za dokazivanje osposobljenosti: podskupina referentnih tvari iz zahtjeva izvedbe kojima se laboratoriji mogu koristiti kako bi dokazali tehničku osposobljenost za provođenje standardiziranog testa. Kriteriji za odabir tih tvari obično uključuju to da predstavljaju cijeli raspon odgovora, da su komercijalno dostupni i da su za njih dostupni visokokvalitetni referentni podaci.

Osposobljenost: dokazana sposobnost za pravilno provođenje testa prije ispitivanja nepoznatih tvari.

Referentni estrogen: 17 β -estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referentne ispitne metode: testovi na kojima se temelji PBTG 493.

RBA: relativni afinitet vezivanja. RBA tvari računa se kao postotak log (IC₅₀) za tvar u odnosu na log (IC₅₀) za 17 β -estradiol.

Relevantnost: opis odnosa između testa i istraživanih učinka te je li test prikladan i koristan za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri testom točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje razmatranje o točnosti (podudarnosti) testa (1.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri test može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija.

SD: standardna devijacija.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

Validirana ispitna metoda: test za koji su provedene validacijske studije za utvrđivanje relevantnosti (uključujući točnost) i pouzdanosti za specifičnu namjenu. Važno je napomenuti da validirana ispitna metoda možda neće biti u dovoljnoj mjeri uspješna s obzirom na točnost i pouzdanost da bi je se moglo smatrati prihvatljivom za predloženu namjenu (1.).

Validacija: proces kojim se utvrđuju pouzdanost i relevantnost određenog pristupa, metode, testa, procesa ili procjene za definiranu svrhu (1.).

Dodatak 2.

FREYBERGER-WILSONOVI IN VITRO TESTOVI VEZIVANJA NA ESTROGENSKI RECEPTOR (ERA) DO ZASIĆENJA I KONKURENTSKOG VEZIVANJA UPOTREBOM CIJELOG REKOMBINANTNOG RECEPTORA ERA

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

1. U ovom *in vitro* testu vezivanja na estrogenski receptor (ERα) do zasićenja i konkurentskog vezivanja upotrebljava se cijeli ljudski receptor ERα(hrERα) koji se proizvodi i izolira iz stanica kukaca zaraženih bakulovirusom. Protokol koji su razvili Freyberger i Wilson podvrgnut je međunarodnoj validacijskoj studiji u više laboratorija (2.) i ona je pokazala njegovu relevantnost i pouzdanost za predviđenu svrhu testa.
2. Ovaj je test postupak probira za utvrđivanje tvari koje se mogu vezati na cijeli receptor hrERα. Upotrebljava se za utvrđivanje sposobnosti ispitivanih kemikalija da se natječu sa 17β-estradiolom u vezivanju na hrERα. Kvantitativni rezultati testa mogu uključivati IC₅₀ (mjera koncentracije ispitivane kemikalije koja je potrebna da se istisne pola [³H]-17β-estradiola s receptora hrERα) i relativne afinitete vezivanja ispitivanih kemikalija za hrERα u usporedbi sa 17β-estradiolom. U svrhu probira kemikalija prihvatljivi kvalitativni rezultati testa mogu uključivati razvrstavanja ispitivanih kemikalija kao kemikalija koje se vežu na hrERα, koje se ne vežu ili koje daju dvosmislen odgovor na temelju kriterija opisanih za krivulje vezivanja.
3. U testu se upotrebljava radioaktivno obilježeni ligand, što znači da laboratorij mora imati dozvolu za radioaktivne materijale. U svim postupcima s radioizotopima i opasnim kemikalijama treba poštovati propise i postupke kako je opisano u nacionalnom zakonodavstvu.
4. Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „OPĆI UVOD” i „SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER”. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj Smjernici za ispitivanje navedene su u Dodatku 1.

NAČELA TESTA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

5. Test vezivanja na hrERα mjeri sposobnost vezivanja radioaktivno obilježenog liganda ([³H]17β-estradiol) na estrogenski receptor u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije (tj. konkurenta). Ispitivane kemikalije koje imaju velik afinitet za estrogenski receptor natječu se s radioaktivno obilježenim ligandom pri nižoj koncentraciji u odnosu na kemikalije s manjim afinitetom za taj receptor.
6. Ovaj se test sastoji od dva glavna elementa: pokusa vezivanja do zasićenja kako bi se opisali parametri interakcije receptora i liganda, nakon čega slijedi pokus konkurentskog vezivanja u kojem se ispitivana kemikalija i radioaktivno obilježeni ligand natječu u vezivanju na estrogenski receptor.
7. Svrha je pokusa vezivanja do zasićenja opisati određenu šaržu receptora u pogledu afiniteta vezivanja i broja u pripremu za pokus konkurentskog vezivanja. Pokusom vezivanja do zasićenja mjeri se, u uvjetima ravnoteže, afinitet fiksne koncentracije estrogenskog receptora za njegov prirodni ligand (koji predstavlja konstanta disocijacije, Kd) i koncentracija aktivnih mjesta na receptorima (Bmax).
8. Pokusom konkurentskog vezivanja mjeri se afinitet tvari da se natječe s [³H]17β-estradiolom u vezivanju na estrogenski receptor. Afinitet se kvantificira koncentracijom ispitivane kemikalije koja, u uvjetima ravnoteže, inhibira 50 % specifičnog vezivanja [³H]17β-estradiola (koja se naziva „50-postotna inhibitora koncentracija” ili IC₅₀). To se može procijeniti i upotrebom relativnog afiniteta vezivanja (RBA, u odnosu na IC₅₀ estradiola koji je izmjeren zasebno u istom ciklusu). Pokusom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje [³H]17β-estradiola pri fiksnoj koncentraciji u prisutnosti širokog raspona (osam redova veličine) koncentracija ispitivanih kemikalija. Ako je moguće, podaci se zatim prilagođavaju u oblik Hillove jednadžbe (Hill, 1910.) koja opisuje istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda konkurentnom kemikalijom koja se veže na jedno mjesto. Mjera istiskivanja radioaktivno obilježenog estradiola u uvjetima ravnoteže upotrebljava se za opis ispitivane kemikalije kao kemikalije koja se veže, koja se ne veže ili koja daje dvosmislen odgovor.

POSTUPAK

Dokazivanje prihvatljivog djelovanja proteina receptora hrER α

9. Prije rutinske provedbe testova vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja za svaku novu šaržu receptora hrER α treba dokazati da ispravno djeluju u laboratoriju u kojem će se upotrebljavati. Za dokazivanje uspješnosti treba upotrijebiti proces koji se sastoji od dva koraka. Riječ je o sljedećim koracima:
- provedbi testa vezivanja [3 H]-17 β -estradiola do zasićenja kako bi se dokazali specifičnost i zasićenje receptora hrER α . Nelinearnom regresijskom analizom tih podataka (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.) i kasnijom Scatchardovom krivuljom treba evidentirati afinitet vezivanja [3 H]-17 β -estradiola na receptor hrER α (Kd) i broj receptora (Bmax) za svaku šaržu receptora hrER α ,
 - provedbi testa konkurentskog vezivanja upotrebom kontrolnih tvari (referentni estrogen (17 β -estradiol)), kemikalije koja se slabo veže (npr. noretinodrel ili noretindron) i kemikalije koja se ne veže (oktil-trietoksisilan, OTES). Svaki laboratorij treba uspostaviti bazu prijašnjih podataka kako bi evidentirao dosljednost vrijednosti IC₅₀ i drugih relevantnih vrijednosti za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže između pokusa i među različitim šaržama receptora hrER α . Parametri krivulja konkurentskog vezivanja za kontrolne tvari trebaju biti unutar ograničenja intervala pouzdanosti od 95 % (vidjeti tablicu 1.) koja su određena na temelju podataka iz laboratorija koji su sudjelovali u validacijskoj studiji za ovaj test (2.).

Tablica 1.

Kriteriji uspješnosti razvijeni za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže, FW test vezivanja na hrER

Tvar	Parametar	Srednja vrijednost ^(a)	Standardna devijacija (n)	Intervali pouzdanosti od 95 % ^(b)	
				Donja granica	Gornja granica
17 β -estradiol	Vrh (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Dno (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hillov nagib	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	LogIC ₅₀ (M)	-8,92 ^(c)	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretinodrel	Vrh (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Dno (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillov nagib	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC ₅₀ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindron ^c	Vrh (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Dno (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillov nagib	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC ₅₀ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

^(a) Srednja vrijednost (n) $\pm$ standardna devijacija (SD) izračunani su na temelju procjena parametara prilagođene krivulje (Hillova jednadžba s četiri parametra) za kontrolne cikluse provedene u četiri laboratorija tijekom validacijske studije (vidjeti Prilog N literaturi pod 2.).

^(b) Intervali pouzdanosti od 95 % navedeni su kao smjernica za kriterije prihvatljivosti.

^(c) U validacijskoj studiji nije bilo obvezno ispitivanje noretindrona za podzadatak 4. (vidjeti literaturu pod 2., vidjeti podzadatak 4). Stoga su srednje vrijednosti $\pm$ standardne devijacije (n) izračunane na temelju procjena prilagođene krivulje (Hillova jednadžba s četiri parametra) za kontrolne cikluse provedene u dva laboratorija.

Raspon za IC₅₀ ovisit će o vrijednosti Kd pripravka receptora i koncentraciji radioaktivnog obilježnog liganda upotrijebljenog u svakom laboratoriju. Bit će prihvatljiva odgovarajuća prilagodba za raspon vrijednosti IC₅₀ na temelju uvjeta korištenih za provedbu testa.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

10. Vidjeti stavke 17. i 18. te tablicu 2. u odjeljku „**SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER**” ove ispitne metode. Svaki test (zasićenje i konkurentsko vezivanje) treba se sastojati od tri neovisna ciklusa (tj. sa svježim razrjeđivanjima receptora, kemikalija i reagensa) provedena na različite dane te svaki ciklus treba sadržavati tri ponavljanja.

Utvrđivanje koncentracije receptora (hrER α)

11. Koncentracija aktivnih receptora malo se razlikuje s obzirom na šaržu i uvjete skladištenja. Zato treba utvrditi koncentraciju aktivnih receptora koja je dobivena od dobavljača. Tako će se dobiti primjerena koncentracija aktivnih receptora u trenutku provedbe ciklusa.
12. Nominalne koncentracije od 0,25, 0,5, 0,75 i 1 nM receptora treba inkubirati bez (ukupno vezivanje) i sa (nespecifično vezivanje) 1 μ M neobilježenog estradiola u uvjetima koji odgovaraju konkurentskom vezivanju (tj. 1 nM [3 H]-estradiola). Specifično vezivanje, izračunano kao razlika ukupnog i nespecifičnog vezivanja, grafički se prikazuje u ovisnosti o nominalnoj koncentraciji receptora. Koncentracija receptora koja pokaže specifične vrijednosti vezivanja koje odgovaraju 20 % dodane radioaktivne oznake povezana je s odgovarajućom nominalnom koncentracijom receptora i tu koncentraciju receptora treba upotrebljavati za pokuse vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja. Konačna koncentracija receptora hrER od 0,5 nM često će ispunjavati taj uvjet.
13. Ako se kriterij od 20 % ne može ispuniti u više navrata, treba provjeriti plan pokusa kako bi se utvrdile potencijalne pogreške. Neuspjeh u ispunjavanju kriterija od 20 % može biti znak toga da u rekombinantnoj šarži ima vrlo malo aktivnih receptora pa treba razmotriti upotrebu druge šarže receptora.

Test zasićenja

14. Osam povećavajućih koncentracija [3 H]17 β -estradiola treba procijeniti u tri ponavljanja, u sljedeća tri uvjeta (vidjeti tablicu 2.):
- bez neobilježenog 17 β -estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. Tako se utvrđuje ukupno vezivanje mjerenjem radioaktivnosti u jažicama u kojima se nalazi samo [3 H]17 β -estradiol,
 - u prisutnosti koncentracije neobilježenog 17 β -estradiola koja je 1 000 veća od koncentracije obilježenog 17 β -estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. Svrha je ovog uvjeta zasititi aktivna vezna mjesta neobilježenim 17 β -estradiolom te mjerenjem radioaktivnosti u jažicama utvrditi nespecifično vezivanje. Sav radioaktivno obilježeni estradiol koji je preostao a koji se može vezati na receptor smatra se vezanim na nespecifično mjesto jer bi neobilježeni estradiol trebao biti prisutan u tako visokoj koncentraciji da se veže na sva dostupna specifična mjesta na receptoru,
 - bez neobilježenog 17 β -estradiola i bez estrogenskog receptora (utvrđivanje ukupne radioaktivnosti).

Priprema otopina [3 H]-17 β -estradiola i neobilježenog 17 β -estradiola

15. Razrjeđivanja [3 H]-17 β -estradiola trebaju se pripremiti dodavanjem testnog pufera u glavnu otopinu [3 H]-17 β -estradiola od 12 nM kako bi se dobile koncentracije koje su prvotno u rasponu od 0,12 nM do 12 nM. Dodavanjem 40 μ l tih otopina odgovarajućim testnim jažicama na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica (u konačnom volumenu od 160 μ l) dobit će se konačne koncentracije testa, u rasponu od 0,03 do 3,0 nM. Priprema testnog pufera, glavne otopine [3 H]-17 β -estradiola i razrjeđivanja te utvrđivanje koncentracija podrobno su opisani u protokolu za FW test (2.).
16. Razrjeđivanja etanolskih otopina 17 β -estradiola treba pripremiti dodavanjem testnog pufera kako bi se dobilo osam povećavajućih koncentracija koje su prvo u rasponu od 0,06 μ M do 6 μ M. Dodavanjem 80 μ l tih otopina odgovarajućim testnim jažicama na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica (u konačnom volumenu od 160 μ l) dobit će se konačne koncentracije testa, u rasponu od 0,03 do 3 μ M. Konačna koncentracija neobilježenog 17 β -estradiola u pojedinačnim testnim jažicama za nespecifično vezivanje treba biti 1 000 puta veća od koncentracije obilježenog [3 H]-17 β -estradiola. Priprema razrjeđivanja neobilježenog 17 β -estradiola podrobno je opisana u protokolu za FW test (2.).

17. Treba upotrebljavati nominalnu koncentraciju receptora koja rezultira specifičnim vezivanjem od $20 \pm 5 \%$ (vidjeti stavke 12. i 13.). Otopinu receptora hrERa treba pripremiti neposredno prije upotrebe.
18. Mikrotitracijske ploče s 96 jažica pripremaju se kako je prikazano u tablici 2., pufera i receptora na pločama naveden je u Dodatku 2.2.

Tablica 2.

Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test vezivanja do zasićenja

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H] E2 + ER			0,06 nM [³ H] E2 + ER			0,08 nM [³ H] E2 + ER			0,10 nM [³ H] E2 + ER			Ukupno vezivanje (otapalo)
B	0,30 nM [³ H] E2 + ER			0,60 nM [³ H] E2 + ER			1,0 nM [³ H] E2 + ER			3,0 nM [³ H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [³ H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [³ H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [³ H] E2 + ER + 0,10 μM E2			Nespec. vezivanje
E	0,30 nM [³ H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [³ H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [³ H] E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [³ H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G													
H													

[³H] E2: [³H]-17β-estradiol

ER: estrogenski receptor

E2: neobilježenog 17β-estradiola

19. Mikrotitracijske ploče testa treba inkubirati na temperaturi od 2 do 8 °C od 16 do 20 sati te ih tijekom razdoblja inkubacije treba staviti u rotator.

Mjerenje [³H]-17β-estradiola koji se vezao na receptore hrERa

20. [³H]-17β-estradiol koji se vezao na receptore hrERa treba odvojiti od slobodnog [³H]-17β-estradiola dodavanjem 80 μl hladne suspenzije DCC-a svakoj jažici, protresanjem mikrotitracijskih ploča deset minuta i centrifugiranjem tijekom deset minuta pri približno 2 500 o/min. Kako bi se tijekom tog procesa smanjila disocijacija vezanog [³H]-17β-estradiola s receptora hrERa, vrlo je važno da se puferi i testne jažice drže na temperaturi od 2 do 8 °C i da se svaki korak provede brzo. Potrebna je jedinica za miješanje za mikrotitracijske ploče kako bi se ploče obradile učinkovito i brzo.
21. Zatim vrlo oprezno treba uzeti 50 μl supernatanta koji sadržava [³H]-17β-estradiol vezan na receptor hrERa kako bi se izbjegla bilo kakva kontaminacija jažica dodirivanjem DCC-a i treba ga staviti na drugu mikrotitracijsku ploču.
22. Zatim u svaku jažicu treba dodati 200 μl scintilacijske tekućine, koja može pretvoriti kinetičku energiju nuklearnih emisija u svjetlosnu energiju (A1–B12 i D1–E12). Jažice G1–H12 (utvrđene kao ukupni dpm) predstavljaju serijska razrjeđivanja [³H]-17β-estradiola (40 μl) koja treba izravno dodati scintilacijskoj tekućini u jažicama ploče za mjerenje, kako je navedeno u tablici 3., tj. te jažice sadržavaju samo 200 μl scintilacijske tekućine i odgovarajuće razrjeđivanje [³H]-17β-estradiola. Te mjere pokazuju koliko je [³H]-17β-estradiola u dpm-ovima dodano svakoj skupini jažica za ukupno vezivanje i nespecifično vezivanje.

Tablica 3.

Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test vezivanja do zasićenja, mjerenje radioaktivnosti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H] E2 + ER			0,06 nM [³ H] E2 + ER			0,08 nM [³ H] E2 + ER			0,10 nM [³ H] E2 + ER			Ukupno vezivanje (otapalo)
B	0,30 nM [³ H] E2 + ER			0,60 nM [³ H] E2 + ER			1,0 nM [³ H] E2 + ER			3,0 nM [³ H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [³ H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [³ H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [³ H] E2 + ER + 0,10 μM E2			Nespec. vezivanje
E	0,30 nM [³ H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [³ H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [³ H] E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [³ H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G	0,03 nM [³ H] E2(ukupno dpm)			0,06 nM [³ H] E2			0,08 nM [³ H] E2			0,10 nM [³ H] E2			Ukupno dpm (*)
H	0,30 nM [³ H] E2			0,60 nM [³ H] E2			1,0 nM [³ H] E2			3,0 nM [³ H] E2			

[³H] E2: [³H]-17β-estradiol

ER: estrogenski receptor

E2: neobilježeni 17β-estradiol

dpm: raspad u minuti

(*) Serijska razrjeđivanja radioaktivno obilježenog [³H] estradiola ovdje treba izravno dodati u 200 μl scintilacijske tekućine u jažicama G1–H12.

23. Mjerenje treba započeti s odgodom od najmanje dva sata i vrijeme brojenja treba iznositi 40 minuta po jažici. Kako bi se utvrdio dpm po jažici, treba upotrijebiti scintilacijski brojač za mikrotitracijske ploče s ispravkom za gašenje. Umjesto toga, ako nije dostupan scintilacijski brojač za mikrotitracijsku ploču, uzorci se mogu mjeriti uobičajenim brojačem. U tim uvjetima treba razmotriti smanjenje vremena brojenja.

Test konkurentskog vezivanja

24. Testom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje jedne koncentracije [³H]-17β-estradiola u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije. Za svaku koncentraciju unutar jednog ciklusa treba upotrijebiti tri istodobna ponovljena uzorka. Osim toga, za svaku ispitanu kemikaliju treba provesti tri istodobna ciklusa. Test treba provesti na jednoj mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica ili više ploča.

Kontrole

25. Pri provedbi testa u svaki pokus istodobno treba uključiti otapalo i kontrole (tj. referentni estrogen, kemikaliju koja se slabo veže i kemikaliju koja se ne veže). Na jednoj ploči tijekom svakog ciklusa treba upotrijebiti cijelu krivulju koncentracija referentnog estrogena i kontrola (tj. kemikalije koja se slabo veže i koja se ne veže). Sve ostale ploče trebaju sadržavati: i. visoku (najveće istiskivanje) i srednju (približno IC₅₀) koncentraciju E2 i kemikalije koja se slabo veže u triplicatima; ii. kontrolu s otapalom i nespecifično vezivanje, najmanje u tri ponavljanja. Postupci za pripremu testnog pufera, kontrola, [³H]-17β-estradiola, receptora hrERa i otopina ispitivanih kemikalija opisani su u literaturi pod 2. (Prilog K, vidjeti protokol za test FW).

Kontrola s otapalom:

26. Kontrola s otapalom pokazuje da otapalo nije u interakciji s ispitnim sustavom i mjeri ukupno vezivanje (TB). Poželjno je otapalo etanol. Umjesto toga, ako najviša koncentracija ispitivane kemikalije nije topljiva u etanolu, može se upotrijebiti DMSO. Koncentracija etanola ili DMSO-a, ako se upotrebljavaju, u konačnim testnim jažicama iznosi 1,5 % i ne smije biti veća od 2 %.

Kontrola s puferom

27. Kontrola s puferom (BC) ne smije sadržavati ni otapalo ni ispitivanu kemikaliju, ali treba sadržavati sve ostale sastavnice testa. Rezultati kontrole s puferom uspoređuju se s kontrolom s otapalom kako bi se potvrdilo da otapalo koje se upotrebljava ne utječe na ispitni sustav.

Kemikalija koja se jako veže (referentni estrogen)

28. Endogeni je ligand 17 β -estradiol (CAS 50-28-2) i on se veže s velikim afinitetom na estrogenski receptor podvrste alfa. Za svaki test konkurentskog vezivanja na hrER α treba pripremiti standardnu krivulju u kojoj se upotrebljava neobilježeni 17 β -estradiol kako bi se omogućila procjena varijabilnosti pri provedbi testa tijekom vremena u istom laboratoriju. Treba pripremiti osam otopina neobilježenog 17 β -estradiola u etanolu, s koncentracijama u testnim jažicama u rasponu od 100 nM do 10 pM (od -7[logM] do -11[logM]), raspoređeno na sljedeći način: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], -9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). Najviša koncentracija neobilježenog 17 β -estradiola (1 μ M) služi i kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja. Ova se koncentracija prepoznaje po oznaci „NSB” u tablici 4. iako je ona isto dio standardne krivulje.

Kemikalija koja se slabo veže

29. Treba uključiti kemikaliju koja se slabo veže (noretinodrel (CAS 68-23-5) ili noretindron (CAS 68-22-4)) kako bi se dokazala osjetljivost svakog pokusa i omogućila procjena varijabilnosti pri provedbi testa tijekom vremena. Treba pripremiti osam otopina kemikalije koja se slabo veže u etanolu, s koncentracijama u testnim jažicama u rasponu od 3 nM do 30 pM (od -8,5[logM] do -4,5[logM]), raspoređeno na sljedeći način: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM].

Kemikalija koja se ne veže

30. Kao negativnu kontrolu (kemikaliju koja se ne veže) treba upotrebljavati oktil-trietoksisilan (OTES, CAS 2 943-75-1). Ona je jamstvo da će se načinom na koji se test provodi otkriti kada se ispitivane kemikalije ne vežu na receptor hrER α . Treba pripremiti osam otopina kemikalije koja se ne veže u etanolu, s koncentracijama u testnim jažicama u rasponu od 0,1 nM do 1 000 μ M (od -10[logM] do -3[logM]), u log povećanjima. Kao alternativna kontrolna kemikalija koja se ne veže može se upotrebljavati di-*n*-butil-ftalat (DBP). Pokazalo se da je njegova najveća topljivost -4[logM].

Koncentracija receptora hrER α

31. Treba upotrebljavati količinu receptora koja daje specifično vezivanje od $20 \pm 5\%$ 1 nM radioaktivno obilježenog liganda (vidjeti stavke 12. i 13. Dodatka 2.). Otopinu receptora hrER α treba pripremiti neposredno prije upotrebe.

[³H]-17 β -estradiol

32. Koncentracija [³H]-17 β -estradiola u testnim jažicama treba biti 1,0 nM.

Ispitivane kemikalije

33. U prvom se redu treba ispitati topljivost kako bi se utvrdila granica topljivosti za svaku ispitivanu kemikaliju i utvrdio primjereni raspon koncentracija za upotrebu u protokolu ispitivanja. Granicu topljivosti svake ispitivane kemikalije prvo treba utvrditi u otapalu i zatim potvrditi u uvjetima testa. Konačna koncentracija koja se ispituje u testu ne smije biti veća od 1 mM. Test za utvrđivanje raspona sastoji se od kontrole s otapalom i osam log-serijskih razrjeđivanja, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM ili manje, na temelju granice topljivosti) i uočene prisutnosti zamućenja ili taloga (vidjeti i stavak 35.). Ispitivanu kemikaliju treba ispitati upotrebom krivulja s osam raspoređenih log koncentracija, kako se utvrdi u prethodnom ispitivanju za utvrđivanje raspona. Koncentracije u drugom i trećem pokusu po potrebi treba prilagoditi kako bi se bolje opisala krivulja koncentracija – odgovor.
34. Razrjeđivanja ispitivane kemikalije treba pripremiti u odgovarajućem otapalu (vidjeti stavak 26. Dodatka 2.). Ako najviša koncentracija ispitivane kemikalije nije topljiva ni u etanolu ni u DMSO-u te bi dodavanjem još otapala koncentracija otapala u konačnoj epruveti porasla iznad prihvatljivog ograničenja, najviša koncentracija može se smanjiti na sljedeću nižu koncentraciju. U tom se slučaju može dodati dodatna koncentracija na donjem kraju niza koncentracija. Ostale koncentracije u nizu ne smiju se mijenjati.

35. Otopine ispitivane kemikalije treba pažljivo pratiti kada se dodaju u testnu jažicu jer se ispitivana kemikalija može nataložiti nakon dodavanja u testnu jažicu. Podatke za sve jažice koje sadržavaju talog treba isključiti iz prilagođavanja krivulje i treba evidentirati razlog za isključivanje podataka.
36. Ako već postoje informacije iz drugih izvora koje pokazuju $\log(IC_{50})$ ispitivane kemikalije, može biti primjereno geometrijski rasporediti razrjeđivanja (tj. polovine log jedinica oko očekivane vrijednosti $\log(IC_{50})$). Konačni rezultat treba odražavati dovoljnu raspoređenost koncentracija na obje strane $\log(IC_{50})$, uključujući „vrh” i „dno”, tako da se krivulja vezivanja može primjereno opisati.

Organizacija testne ploče

37. Označene mikrotitracijske ploče treba pripremiti razmatrajući inkubacije u šest ponavljanja sa šiframa za kontrolu s otapalom, najviše koncentracije referentnog estrogena koji služi i kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja (NSB) i kontrole s puferom te uzimajući u obzir inkubacije u tri ponavljanja sa šiframa za svaku od osam koncentracija kontrole koja se ne veže (oktil-trietoksisilan), sedam nižih koncentracija za referentni estrogen, osam razina koncentracije kemikalije koja se slabo veže i osam koncentracija svake ispitivane kemikalije (TC). Primjer rasporeda dijagrama ploče za cijele krivulje koncentracija referentnog estrogena i kontrola naveden je u tablici 4. u nastavku. Za ispitivanu kemikaliju upotrebljavaju se dodatne mikrotitracijske ploče koje trebaju uključivati kontrole na ploči, tj.: 1. visoku (najveće istiskivanje) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i kemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; 2. kontrolu s otapalom i nespecifično vezivanje u šest ponavljanja (tablica 5.). Primjer radnog lista s rasporedom na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja s tri nepoznate ispitivane kemikalije naveden je u Dodatku 2.3. Koncentracije navedene u tablicama 4. i 5. konačne su koncentracije testa. Najveća koncentracija za E2 treba iznositi 1×10^{-7} M, a za kemikaliju koja se slabo veže treba upotrebljavati najvišu koncentraciju koja se upotrebljavala za kemikaliju koja se slabo veže na ploči 1. Laboratorij mora utvrditi koncentraciju IC_{50} na temelju svoje baze podataka o prijašnjim kontrolama. Očekuje se da će ta vrijednost biti slična vrijednosti uočenoj u validacijskim studijama (vidjeti tablicu 1.).

Tablica 4.

Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja, cijele krivulje koncentracija referentnog estrogena i kontrola (ploča 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (samo otapalo)			TB (samo otapalo)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8.5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9.5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Slijepa proba (*)		
D	NE ($1 \times 10^{-4.5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5.5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6.5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7.5}$)			NE ($1 \times 10^{-8.5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Slijepa proba (za radioakt.) (**)			Slijepa proba (za radioakt.) (**)			Kontrola s puferom			Kontrola s puferom		

U ovom se primjeru kao kemikalija koja se slabo veže upotrebljava noretinodrel (NE)

(*) Stvarna slijepa proba, jažica se ne upotrebljava.

(**) Slijepa proba ne upotrebljava se tijekom inkubacije, ali se upotrebljava za potvrđivanje ukupne dodane radioaktivnosti.

Tablica 5.

Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja, cijele krivulje koncentracija ispitivane kemikalije i kontrola na ploči

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (samo otapalo)			TB (samo otapalo)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC ₅₀)			NE ($1 \times 10^{-4.5}$)			E2 (IC ₅₀)			E2 (1×10^{-7})		

U ovom se primjeru kao kemikalija koja se slabo veže upotrebljava noretinodrel (NE)

Dovršetak testa konkurentskog vezivanja

38. Kako je prikazano u tablici 6., u jažice treba dodati 80 μ l kontrole s otapalom, kontrole s puferom, referentnog estrogena, kemikalije koja se slabo veže, kemikalije koja se ne veže i ispitivanih kemikalija pripremljenih u testnom puferu. Zatim u svaku jažicu treba dodati 40 μ l otopine 4 nM [³H]-17 β -estradiola. Nakon lagane rotacije od 10 do 15 minuta na temperaturi od 2 do 8 °C, treba dodati 40 μ l otopine receptora hrER α . Mikrotitracijske ploče testa treba inkubirati na temperaturi od 2 do 8 °C od 16 do 20 sati te ih tijekom razdoblja inkubacije treba staviti u rotator.

Tablica 6.

Volumen sastavnica testa za test konkurentskog vezivanja na hrER, mikrotitracijske ploče

Volumen (μ l)	Sastojak
80	Neobilježeni 17 β -estradiol, noretinodrel, OTES, ispitivane kemikalije, otapalo ili pufer
40	otopina 4 nM [³ H]-17 β -estradiola
40	otopina hrER α , koncentracija kako je utvrđena
160	Ukupni volumen u svakoj testnoj jažici

39. Zatim treba kvantificirati [³H]-17 β -estradiol vezan na receptore hrER α , nakon odvajanja [³H]-17 β -estradiola vezanog na receptore hrER α od slobodnog [³H]-17 β -estradiola dodavanjem 80 μ l suspenzije hladnog DCC-a u svaku jažicu, kako je opisano u stavcima od 20. do 23. za test vezivanja do zasićenja.
40. Jažice H1–6 (utvrđene kao slijepe probe (za radioaktivnost) u tablici 4.) predstavljaju dpm radioaktivno obilježenog [³H] estradiola u 40 μ l. Alikvot od 40 μ l treba izravno dodati scintilacijskoj tekućini u jažicama H1–H6.

Kriteriji prihvatljivosti

Test vezivanja do zasićenja

41. Krivulja specifičnog vezivanja treba dosegnuti plato kako se upotrebljavaju povećavajuće koncentracije [^3H]-17 β -estradiola, što ukazuje na zasićenje receptora hrERa ligandom.
42. Specifično vezivanje pri 1 nM [^3H]-17 β -estradiola treba biti unutar prihvatljivog raspona od 15 % do 25 % prosječne izmjerene ukupne radioaktivnosti dodane u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstupanja od tog raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi i treba ponoviti test zasićenja.
43. Iz podataka bi trebala nastati linearna Scatchardova krivulja.
44. Nespecifično vezivanje ne bi trebalo biti preveliko. Vrijednost za nespecifično vezivanje obično bi trebala biti < 35 % ukupnog vezivanja. Međutim, omjer povremeno može biti veći od tog ograničenja kada se mjeri vrlo niski dpm za najniže koncentracije ispitane radioaktivno obilježene 17 β -estradiola.

Test konkurentskog vezivanja

45. Povećavanjem koncentracija neobilježenog 17 β -estradiola trebao bi se istisnuti [^3H]-17 β -estradiol s receptora na način koji je dosljedan konkurentskom vezivanju na jedno mjesto.
46. Vrijednost IC_{50} za referentni estrogen (tj. 17 β -estradiol) treba biti približno jednaka molarnoj koncentraciji [^3H]-17 β -estradiola uvećanoj za K_d utvrđen u testu vezivanja do zasićenja.
47. Ukupno specifično vezivanje dosljedno bi trebalo biti unutar prihvatljivog raspona od 20 ± 5 % ako je prosječna izmjerena koncentracija ukupne radioaktivnosti dodane svakoj jažici iznosila 1 nM u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstupanja od tog raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi.
48. Otapalo ne bi smjelo promijeniti osjetljivost ili obnovljivost testa. Rezultati kontrole s otapalom (jažice TB) uspoređuju se s kontrolom s puferom kako bi se potvrdilo da otapalo koje se upotrebljava ne utječe na ispitni sustav. Ako otapalo ne utječe na test, rezultati TB-a i kontrole s puferom trebaju biti usporedivi.
49. Kemikalija koje se ne veže ne bi trebala istisnuti više od 25 % [^3H]-17 β -estradiola s receptora hrERa ako se ispituje do 10^{-3} M (OTES) ili 10^{-4} M (DBP).
50. Kriteriji uspješnosti razvijeni su za referentni estrogen i dvije kemikalije koje se slabo vežu (npr. noretinodrel, noretindron) upotrebom podataka iz validacijske studije FW testa vezivanja na hrER (Prilog N literaturi pod 2.). Intervali pouzdanosti od 95 % navode se za srednju vrijednost (n) $\pm$ standardnu devijaciju za sve kontrolne cikluse u svim laboratorijima koji sudjeluju u validacijskoj studiji. Intervali pouzdanosti od 95 % izračunani su za parametre prilagođene krivulje (tj. vrh, dno, Hillov nagib, $\log\text{IC}_{50}$) za referentni estrogen i kemikalije koje se slabo vežu te za $\log\text{10RBA}$ kemikalija koje se slabo vežu u odnosu na referentni estrogen te se navode kao kriteriji uspješnosti za pozitivne kontrole. U tablici 1. navedeni su očekivani rasponi za parametre prilagođene krivulje koji se mogu upotrebljavati kao kriteriji uspješnosti. U praksi se raspon vrijednosti IC_{50} može neznatno razlikovati ovisno o vrijednosti K_d priprema receptora i koncentraciji liganda.

51. Za parametre prilagođene krivulje za ispitivane kemikalije nisu razvijeni kriteriji uspješnosti zbog velikog raspona postojećih potencijalnih ispitivanih kemikalija i varijacije u mogućim afinitetima i ishodima (npr. cijela krivulja, djelomična krivulja, bez prilagođavanja krivulje). Međutim, pri pregledu rezultata iz svakog ciklusa za ispitivanu kemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu. Treba upotrijebiti dovoljan raspon koncentracija ispitivane kemikalije kako bi se jasno utvrdio vrh (npr. od 90 do 100 % vezivanja) konkurentne krivulje. Varijabilnost među ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije te među tri neistodobna ciklusa treba biti razumna i znanstveno opravdana. Kontrole iz svakog ciklusa za ispitivanu kemikaliju trebale bi se približiti mjerama uspješnosti koje su navedene za ovaj FW test i biti dosljedne prijašnjim podacima o kontrolama iz svakog odgovarajućeg laboratorija.

ANALIZA PODATAKA

Test vezivanja do zasićenja

52. Mjere se i ukupno i nespecifično vezivanje. Iz tih se vrijednosti računa specifično vezivanje povećavajućih koncentracija [^3H]-17 β -estradiola u uvjetima ravnoteže tako da se nespecifično vezivanje oduzme od ukupnoga. Grafikon specifičnog vezivanja u odnosu na koncentraciju [^3H]-17 β -estradiola treba dosegnuti plato za najveće specifično vezivanje koje ukazuje na zasićenje receptora hrERa [^3H]-17 β -estradiolom. Osim toga, analizom podataka treba evidentirati vezivanje [^3H]-17 β -estradiola na jedno vezno mjesto s velikim afinitetom. Nespecifično, ukupno i specifično vezivanje treba prikazati na krivulji vezivanja do zasićenja. Za daljnju analizu tih podataka treba upotrijebiti nelinearnu regresijsku analizu (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.), s konačnim prikazom podataka u obliku Scatchardove krivulje.
53. Analizom podataka treba utvrditi Bmax i Kd samo iz podataka o ukupnom vezivanju upotrebom pretpostavke da je nespecifično vezivanje linearno, osim ako se obrazloži upotreba druge metode. Osim toga, pri utvrđivanju najbolje prilagodbe treba upotrijebiti temeljitu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji odabir. Treba navesti metodu odabranu za temeljitu regresiju. Kod utvrđivanja vrijednosti Bmax i Kd iz podataka o vezivanju do zasićenja uvijek treba primijeniti ispravak potrošnje liganada (npr. upotrebom Swillensove metode iz 1995.).

Test konkurentskog vezivanja

54. Krivulja konkurentskog vezivanja grafički se prikazuje kao specifično vezivanje [^3H]-17 β -estradiola u odnosu na koncentraciju (log10 jedinice) konkurenta. Koncentracija ispitivane kemikalije koja inhibira 50 % najvećeg specifičnog vezivanja [^3H]-17 β -estradiola čini vrijednost IC₅₀.
55. Procjene za vrijednosti log(IC₅₀) za pozitivne kontrole (npr. referentni estrogen i kemikalija koja se slabo veže) treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krivulje kako bi se prilagodila Hillova jednačba s četiri parametra (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.). Vrh, dno, nagib i log(IC₅₀) obično ne bi trebalo ograničavati pri prilagođavanju tih krivulja. Pri utvrđivanju najbolje prilagodbe treba upotrijebiti temeljitu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji odabir. Ne treba primijeniti ispravak potrošnje liganada. Nakon početne analize svaku krivulju vezivanja treba pregledati kako bi se osigurala odgovarajuća prilagodba modelu. Relativni afinitet vezivanja (RBA) za kemikaliju koja se slabo veže treba izračunati kao postotak log (IC₅₀) za kemikaliju koja se slabo veže u odnosu na log (IC₅₀) za 17 β -estradiol. Rezultate iz pozitivnih kontrola i kontrola s kemikalijama koje se ne vežu treba procijeniti upotrebom mjera uspješnosti testa iz stavaka od 45. do 50. u ovom Dodatku 2.
56. Podatke za sve ispitivane kemikalije treba analizirati upotrebom stupnjevito pristupa kako bi se osiguralo da su podaci primjerenom analizirani i da je svaka krivulja konkurentskog vezivanja pravilno razvrstana. Preporučuje se da se svaki ciklus za ispitivanu kemikaliju prvo podvrgne standardiziranoj analizi podataka koja je identična analizi upotrijebljenoj za referentni estrogen i kontrolne kemikalije koje se slabo vežu (vidjeti prethodni stavak 55.). Kada se to dovrši, treba izvršiti tehnički pregled parametara prilagođene krivulje i vizualni pregled mjere u kojoj podaci odgovaraju izrađenoj krivulji konkurentskog vezivanja za svaki ciklus. Tijekom tog tehničkog pregleda dobar pokazatelj toga da su test i analiza podataka pravilno provedeni uključuju opažanje smanjenja postotka specifično vezanog [^3H]-17 β -estradiola koje ovisi o koncentraciji, malu varijabilnost među tehničkim ponavljanjima pri svakoj koncentraciji kemikalije i dosljednost u parametrima prilagodbe među tri ciklusa.

Tumačenje podataka

57. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se kemikalijom koja se veže na receptor hrERα ako se krivulja vezivanja može prilagoditi, a najniža točka na krivulji odgovora u rasponu podataka manja je od 50 % (slika 1.).
58. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se kemikalijom koja se ne veže na receptor hrERα:
- ako se krivulja vezivanja može prilagoditi i ako je najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora u rasponu podataka veća od 75 %, ili
 - ako se krivulja vezivanja ne može prilagoditi i ako je najniži neizgladeni prosječni postotak vezivanja među skupinama koncentracija u podacima veći od 75 %.
59. Smatra se da ispitivane kemikalije daju dvosmislen odgovor ako se ne ispuni nijedan od prethodno navedenih uvjeta (npr. najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

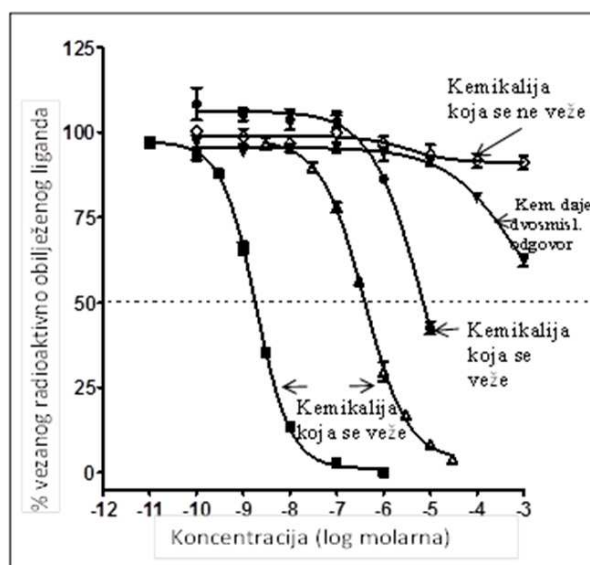
Tablica 7.

Kriteriji za dodjelu razvrstavanja na temelju krivulje konkurentskog vezivanja za ispitivanu kemikaliju

Razvrstavanje	Kriteriji
Kemikalija koja se veže ^a	Može se prilagoditi krivulja vezivanja. Najniža točka na krivulji odgovora u rasponu podataka manja je od 50 %.
Kemikalija koja se ne veže ^b	Ako se krivulja vezivanja može prilagoditi, najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora u rasponu podataka veća je od 75 %. Ako se krivulja vezivanja ne može prilagoditi, najniži neizgladeni prosječni postotak vezivanja među skupinama koncentracija u podacima veći je od 75 %.
Daje dvosmislen odgovor ^c	Bilo koji ciklus koji se može ispitati, a nije ni kemikalija koja se veže ni koja se ne veže (npr. najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

Slika 1.

Primjeri razvrstavanja ispitivanih kemikalija upotrebom krivulje konkurentskog vezivanja



60. Višestruki ciklusi koji se provedu u laboratoriju za ispitivanu kemikaliju kombiniraju se dodjeljivanjem numeričkih vrijednosti svakom ciklusu i određivanjem prosjeka svih ciklusa kako je prikazano u tablici 8. Rezultati za kombinirane cikluse u svakom laboratoriju uspoređuju se s očekivanim razvrstavanjem za svaku ispitivanu kemikaliju.

Tablica 8.

Metoda za razvrstavanje ispitivane kemikalije upotrebom višestrukih ciklusa unutar laboratorija

Za dodjelu vrijednosti svakom ciklusu:	
Razvrstavanje	Brojčana vrijednost
Kemikalija koja se veže	2
Daje dvosmislen odgovor	1
Kemikalija koja se ne veže	0
Za razvrstavanje prosječne brojčane vrijednosti u svim ciklusima:	
Razvrstavanje	Brojčana vrijednost
Kemikalija koja se veže	Prosječno $\geq 1,5$
Daje dvosmislen odgovor	$0,5 \leq \text{prosječno} < 1,5$
Kemikalija koja se ne veže	Prosječno $< 0,5$

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

61. Vidjeti stavak 24. u odjeljku „SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER” ove ispitne metode.

Dodatak 2.1.

POPIS TERMINA

[³H]E2: 17β-estradiol radioaktivno obilježen tricijem.

DCC: ugljen premazan dekstranom.

E2: neobilježeni 17β-estradiol (inertni).

Testni pufer: 10 mM trisa, 10 mg/ml goveđeg serumskog albumina, 2 mM DTT-a, 10-postotnoga glicerola, 0,2 mM leupeptina, pH-vrijednost od 7,5.

hrERα: ljudski rekombinantni estrogenski receptor alfa.

Ponavljanje: jedna od više jažica s istim sadržajem u istoj koncentraciji koje se ispituju istodobno u istom ciklusu. U ovom se protokolu svaka koncentracija ispitivane kemikalije ispituje u tri ponavljanja; drugim riječima, tri se ponavljanja ispituju istovremeno pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije.

Ciklus: cijeli skup jažica s istodobno provedenim testovima na mikrotitracijskoj ploči koji daje sve informacije potrebne za opis vezivanja ispitivane kemikalije na receptor hrERα (odnosno ukupni [³H]-17β-estradiol dodan testnoj jažici, najveće vezivanje [³H]-17β-estradiola na receptore hrERα, nespecifično vezivanje i ukupno vezivanje pri različitim koncentracijama ispitivane kemikalije). Ciklus se može sastojati od samo jedne testne jažice (tj. ponovljeni uzorak) po koncentraciji, ali zbog toga što se ovim protokolom zahtijeva ispitivanje u tri ponavljanja, jedan se ciklus sastoji od tri testne jažice po koncentraciji. Osim toga, ovim se protokolom zahtijevaju tri neovisna (tj. neistodobna) ciklusa po kemikaliji.

Dodatak 2.2.

UOBIČAJENI TEST ZASIĆENJA S $[^3\text{H}]$ -17 β -ESTRADIOLOM S TRI JAŽICE S PONAVLJANJEM

Uobičajeni test zasićenja s $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiolom s tri jažice s ponavljanjem											
Položaj	Ponavlanje	Šifra vrste jažice	Početna koncentracija rad. obilj. E2 (nM)	Volumen radioaktivno obilježenog E2 (μl)	Konačna koncentracija radioaktivno obilježenog E2 (nM)	Početna koncentracija neobilježenog E2 (μM)	Volumen neobilježenog E2 (μl)	Konačna koncentracija neobilježenog E2 (μM)	Volumen pufera (μl)	Volumen receptora (μl)	Ukupni volumen u jažicama
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

Uobičajeni test zasićenja s [³H]-17β-estradiolom s tri jažice s ponavljanjem

Položaj	Ponavljanje	Šifra vrste jažice	Početna koncentracija rad. obilj. E2 (nM)	Volumen radioaktivno obilježenog E2 (μl)	Konačna koncentracija radioaktivno obilježenog E2 (nM)	Početna koncentracija neobilježenog E2 (μM)	Volumen neobilježenog E2 (μl)	Konačna koncentracija neobilježenog E2 (μM)	Volumen pufera (μl)	Volumen receptora (μl)	Ukupni volumen u jažicama
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

Uobičajeni test zasićenja s [³H]-17β-estradiolom s tri jažice s ponavljanjem

Položaj	Ponavljanje	Šifra vrste jažice	Početna koncentracija rad. obilj. E2 (nM)	Volumen radioaktivno obilježenog E2 (μl)	Konačna koncentracija radioaktivno obilježenog E2 (nM)	Početna koncentracija neobilježenog E2 (μM)	Volumen neobilježenog E2 (μl)	Konačna koncentracija neobilježenog E2 (μM)	Volumen pufera (μl)	Volumen receptora (μl)	Ukupni volumen u jažicama
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	radioa- kt.	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	radioa- kt.	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	radioa- kt.	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	radioa- kt.	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	radioa- kt.	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	radioa- kt.	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	radioa- kt.	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	radioa- kt.	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	radioa- kt.	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	radioa- kt.	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	radioa- kt.	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	radioa- kt.	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	radioa- kt.	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	radioa- kt.	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	radioa- kt.	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	radioa- kt.	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Uobičajeni test zasićenja s [³H]-17β-estradiolom s tri jažice s ponavljanjem

Položaj	Ponavljanje	Šifra vrste jažice	Početna koncentracija rad. obilj. E2 (nM)	Volumen radioaktivno obilježenog E2 (μl)	Konačna koncentracija radioaktivno obilježenog E2 (nM)	Početna koncentracija neobilježenog E2 (μM)	Volumen neobilježenog E2 (μl)	Konačna koncentracija neobilježenog E2 (μM)	Volumen pufera (μl)	Volumen receptora (μl)	Ukupni volumen u jažicama
H5	2	radioa-kt.	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	radioa-kt.	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	radioa-kt.	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	radioa-kt.	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	radioa-kt.	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	radioa-kt.	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	radioa-kt.	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	radioa-kt.	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Napominje se da su „radioaktivne” jažice prazne tijekom inkubacije. Dodaje se 40 μl samo za brojenje scintilacijom.

Dodatak 2.3.

RASPORED JAŽICA ZA TEST KONKURENTSKOG VEZIVANJA

Ploča	Položaj	Ponavljjanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (μl)	Volumen s ploče za razrjeđivanje (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	A1	1	ukupno vezi- vanje	TB	TB1	–	40		40	80	160	–
S	A2	2	ukupno vezi- vanje	TB	TB2	–	40		40	80	160	–
S	A3	3	ukupno vezi- vanje	TB	TB3	–	40		40	80	160	–
S	A4	1	ukupno vezi- vanje	TB	TB4	–	40		40	80	160	–
S	A5	2	ukupno vezi- vanje	TB	TB5	–	40		40	80	160	–
S	A6	3	ukupno vezi- vanje	TB	TB6	–	40		40	80	160	–
S	A7	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	neobilježeni E2	S	S1	2,00E-07	40	–	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	neobilježeni E2	S	S1	2,00E-07	40	–	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	neobilježeni E2	S	S1	2,00E-07	40	–	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	neobilježeni E2	S	S2	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	neobilježeni E2	S	S2	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	neobilježeni E2	S	S2	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	neobilježeni E2	S	S3	6,00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	neobilježeni E2	S	S3	6,00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	neobilježeni E2	S	S3	6,00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (μl)	Volumen s ploče za razrjeđivanje (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	B10	1	neobilježeni E2	S	S4	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	neobilježeni E2	S	S4	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	neobilježeni E2	S	S4	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	neobilježeni E2	S	S5	6,00E-10	40	–	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	neobilježeni E2	S	S5	6,00E-10	40	–	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	neobilježeni E2	S	S5	6,00E-10	40	–	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	neobilježeni E2	S	S6	2,00E-10	40	–	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	neobilježeni E2	S	S6	2,00E-10	40	–	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	neobilježeni E2	S	S6	2,00E-10	40	–	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	neobilježeni E2	S	S7	2,00E-11	40	–	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	neobilježeni E2	S	S7	2,00E-11	40	–	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	neobilježeni E2	S	S7	2,00E-11	40	–	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	slijepa proba	slij. proba	B1	–	–	160	–	–	160	–
S	C11	2	slijepa proba	slij. proba	B2	–	–	160	–	–	160	–
S	C12	3	slijepa proba	slij. proba	B3	–	–	160	–	–	160	–
S	D1	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	–	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	–	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	–	40	80	160	1,0E-05

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (μl)	Volumen s ploče za razrjeđivanje (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	D7	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	–	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	–	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	–	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	noretinodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretinodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretinodrel	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP	2.00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretinodrel	NE	WP	6.00E-08	40	–	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	noretinodrel	NE	WP	6.00E-08	40	–	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretinodrel	NE	WP	6.00E-08	40	–	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretinodrel	NE	WP	6.00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (μl)	Volumen s ploče za razrjeđivanje (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	E11	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	–	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	–	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	–	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	–	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	–	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	–	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	–	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	–	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	–	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	–	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	–	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	–	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna koncentracija konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (μl)	Volumen s ploče za razrjeđivanje (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	–	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	–	40	–	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	–	40	–	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	–	40	–	160	1,0E-10
S	H1	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H2	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H3	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H4	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H5	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H6	1	radioakt.	H	H	–	–	–	40	–	40	–
S	H7	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H8	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H9	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H10	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H11	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–
S	H12	1	kontrola s puferom	BC	BC	–	40	80	40	–	160	–

Napominje se da su „radioaktivne” jažice prazne tijekom inkubacije. Dodaje se 40 μl samo za brojenje scintilacijom.

Raspored jažica za test konkurentskog vezivanja

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	A1	1	ukupno vezivanje	TB	TBB1B1	–	40	–	40	80	160	–
P1	A2	2	ukupno vezivanje	TB	TB2	–	40	–	40	80	160	–
P1	A3	3	ukupno vezivanje	TB	TB3	–	40	–	40	80	160	–
P1	A4	1	ukupno vezivanje	TB	TB4	–	40	–	40	80	160	–
P1	A5	2	ukupno vezivanje	TB	TB5	–	40	–	40	80	160	–
P1	A6	3	ukupno vezivanje	TB	TB6	–	40	–	40	80	160	–
P1	A7	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	neob. E2 (visoki)	NSB	S0	2,00E-06	40	–	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	ispit. kemikalija 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	ispit. kemikalija 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	ispit. kemikalija 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	ispit. kemikalija 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	ispit. kemikalija 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	ispit. kemikalija 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	ispit. kemikalija 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	ispit. kemikalija 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	ispit. kemikalija 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	ispit. kemikalija 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	ispit. kemikalija 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	ispit. kemikalija 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Raspored jažica za test konkurentskog vezivanja

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	C1	1	ispit. kemikalija 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	ispit. kemikalija 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	ispit. kemikalija 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	ispit. kemikalija 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	ispit. kemikalija 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	ispit. kemikalija 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	ispit. kemikalija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	ispit. kemikalija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	ispit. kemikalija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	ispit. kemikalija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	ispit. kemikalija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	ispit. kemikalija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	ispit. kemikalija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	ispit. kemikalija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	ispit. kemikalija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	ispit. kemikalija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	ispit. kemikalija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	ispit. kemikalija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	ispit. kemikalija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	ispit. kemikalija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	ispit. kemikalija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	ispit. kemikalija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	ispit. kemikalija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	ispit. kemikalija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Raspored jažica za test konkurentskog vezivanja

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	E1	1	ispit. kemikalija	2 TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	ispit. kemikalija	2 TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	ispit. kemikalija	2 TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	ispit. kemikalija	2 TC2	6	–	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	ispit. kemikalija	2 TC2	6	–	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	ispit. kemikalija	2 TC2	6	–	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	ispit. kemikalija	2 TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	ispit. kemikalija	2 TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	ispit. kemikalija	2 TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	ispit. kemikalija	2 TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	ispit. kemikalija	2 TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	ispit. kemikalija	2 TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	ispit. kemikalija	3 TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	ispit. kemikalija	3 TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	ispit. kemikalija	3 TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	ispit. kemikalija	3 TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	ispit. kemikalija	3 TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	ispit. kemikalija	3 TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	ispit. kemikalija	3 TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	ispit. kemikalija	3 TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	ispit. kemikalija	3 TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	ispit. kemikalija	3 TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	ispit. kemikalija	3 TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	ispit. kemikalija	3 TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Raspored jažica za test konkurentskog vezivanja

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Početna konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilježivača (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	G1	1	ispit. kemikalija	3 TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	ispit. kemikalija	3 TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	ispit. kemikalija	3 TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	ispit. kemikalija	3 TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	ispit. kemikalija	3 TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	ispit. kemikalija	3 TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	ispit. kemikalija	3 TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	ispit. kemikalija	3 TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	ispit. kemikalija	3 TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	ispit. kemikalija	3 TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	ispit. kemikalija	3 TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	ispit. kemikalija	3 TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noretinodrel	NE		IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrel	NE		IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrel	NE		IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	neobilježeni E2 S			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	neobilježeni E2 S			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	neobilježeni E2 S			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	neobilježeni E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	neobilježeni E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	neobilježeni E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

Dodatak 3.

IN VITRO TEST VEZIVANJA NA ESTROGENSKI RECEPTOR UPOTREBOM LJUDSKOG REKOMBINANTNOG PROTEINA DOMENE VEZIVANJA LIGANDA RECEPTORA ERA KOJI JE RAZVIO CERi (INSTITUT ZA PROCJENU I ISTRAŽIVANJE KEMIČALIJA)

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

1. U ovom *in vitro* testu vezivanja na estrogenski receptor (ER α) do zasićenja i konkurentskog vezivanja upotrebljava se domena vezivanja liganda (LBD) ljudskog receptora ER α (hrER α). Taj konstrukt proteina proizveo je CERi (institut za procjenu i istraživanje kemikalija) iz Japana te on postoji kao fuzijski protein glutation S-transferaza (GST) i eksprimira se u bakteriji *E. coli*. CERi-jev protokol podvrgnut je međunarodnoj validacijskoj studiji u više laboratorija (2.) koja je pokazala njegovu relevantnost i pouzdanost za predviđenu svrhu testa.
2. Ovaj je test postupak probira za utvrđivanje tvari koje se mogu vezati na receptor hrER α . Upotrebljava se za utvrđivanje sposobnosti ispitivanih kemikalija da se natječu sa 17 β -estradiolom u vezivanju na domenu vezivanja liganda receptora hrER α . Kvantitativni rezultati testa mogu uključivati IC₅₀ (mjera koncentracije ispitivane kemikalije koja je potrebna da se istisne pola [³H]-17 β -estradiola s receptora hrER α) i relativne afinitete vezivanja ispitivanih kemikalija na hrER α u usporedbi sa 17 β -estradiolom. U svrhu probira kemikalija prihvatljivi kvalitativni rezultati testa mogu uključivati razvrstavanja ispitivanih kemikalija kao kemikalija koje se vežu na hrER α , koje se ne vežu ili koje daju dvosmislen odgovor na temelju kriterija opisanih za krivulje vezivanja.
3. U testu se upotrebljava radioaktivno obilježeni ligand, što znači da laboratorij mora imati dozvolu za radioaktivne materijale. U svim postupcima s radioizotopima i opasnim kemikalijama treba poštovati propise i postupke kako je opisano u nacionalnom zakonodavstvu.
4. Prije upotrebe ovog testa u regulatorne svrhe treba pročitati odjeljke „**OPĆI UVOD**” i „**SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER**”. Definicije i kratice upotrijebljene u ovoj Smjernici za ispitivanje navedene su u Dodatku 1.

NAČELA TESTA (VIDJETI I OPĆI UVOD)

5. Test vezivanja na hrER α mjeri sposobnost vezivanja radioaktivno obilježenog liganda ([³H]17 β -estradiol) na estrogenski receptor u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije (tj. konkurenta). Ispitivane kemikalije koje imaju velik afinitet za estrogenski receptor natječu se s radioaktivno obilježenim ligandom pri nižoj koncentraciji u odnosu na kemikalije s manjim afinitetom za taj receptor.
6. Ovaj se test sastoji od dva glavna elementa: pokusa vezivanja do zasićenja kako bi se opisali parametri interakcije receptora i liganda, nakon čega slijedi pokus konkurentskog vezivanja u kojem se ispitivana kemikalija i radioaktivno obilježeni ligand natječu u vezivanju na estrogenski receptor.
7. Svrha je pokusa vezivanja do zasićenja opisati određenu šaržu receptora u pogledu afiniteta vezivanja i broja u pripremu za pokus konkurentskog vezivanja. Pokusom vezivanja do zasićenja mjeri se, u uvjetima ravnoteže, afinitet fiksne koncentracije estrogenskog receptora za njegov prirodni ligand (koji predstavlja konstanta disocijacije, Kd) i koncentracija aktivnih mjesta na receptorima (Bmax).
8. Pokusom konkurentskog vezivanja mjeri se afinitet tvari da se natječe s [³H]17 β -estradiolom u vezivanju na estrogenski receptor. Afinitet se kvantificira koncentracijom ispitivane kemikalije koja, u uvjetima ravnoteže, inhibira 50 % specifičnog vezivanja [³H]17 β -estradiola (koja se naziva „50-postotna inhibitorska koncentracija” ili IC₅₀). To se može procijeniti i upotrebom relativnog afiniteta vezivanja (RBA, u odnosu na IC₅₀ estradiola koji je izmjeren zasebno u istom ciklusu). Pokusom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje [³H]17 β -estradiola pri fiksnoj koncentraciji u prisutnosti širokog raspona (osam redova veličine) koncentracija ispitivanih kemikalija. Ako je moguće, podaci se zatim prilagođavaju u oblik Hillove jednadžbe (Hill, 1910.) koja opisuje istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda konkurentnom kemikalijom koja se veže na jedno mjesto. Mjera istiskivanja radioaktivno obilježenog estradiola u uvjetima ravnoteže upotrebljava se za opis ispitivane kemikalije kao kemikalije koja se veže, koja se ne veže ili koja daje dvosmislen odgovor.

POSTUPAK

Dokazivanje prihvatljivog djelovanja proteina receptora hrERα

9. Prije rutinske provedbe testova vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja za svaku novu šaržu receptora hrERα treba dokazati da ispravno djeluju u laboratoriju u kojem će se upotrebljavati. Za dokazivanje uspješnosti treba upotrijebiti proces koji se sastoji od dva koraka. Riječ je o sljedećim koracima:
- provedbi testa vezivanja [^3H]-17 β -estradiola do zasićenja kako bi se dokazali specifičnost i zasićenje receptora hrERα. Nelinearnom regresijskom analizom tih podataka (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.) i kasnijom Scatchardovom krivuljom treba evidentirati afinitet vezivanja [^3H]-17 β -estradiola na receptor hrERα (Kd) i broj receptora (Bmax) za određenu šaržu receptora hrERα,
 - provedbi testa konkurentskog vezivanja upotrebom kontrolnih tvari (referentni estrogen (17 β -estradiol), kemikalije koja se slabo veže (npr. noretinodrel ili noretindron) i kemikalije koja se ne veže (oktil-trietoksisilan, OTES)). Svaki laboratorij treba uspostaviti bazu prijašnjih podataka kako bi evidentirao dosljednost vrijednosti IC₅₀ i relevantnih vrijednosti za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže između pokusa i među različitim šaržama receptora hrERα. Osim toga, parametri krivulja konkurentskog vezivanja za kontrolne tvari trebaju biti unutar ograničenja intervala pouzdanosti od 95 % (vidjeti tablicu 1.) koja su razvijena upotrebom podataka iz laboratorija koji su sudjelovali u validacijskoj studiji za ovaj test (2.).

Tablica 1

Kriteriji uspješnosti razvijeni za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže, CERi-jev test vezivanja na hrER

Tvar	Parametar	Srednja vrijednost ^(a)	Standardna devijacija (n)	Intervali pouzdanosti od 95 % ^(b)	
				Donja granica	Gornja granica
17β-estradiol	Vrh	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Dno	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hillov nagib	– 1,22	0,20 (70)	– 1,27	– 1,17
	LogIC ₅₀	– 8,93	0,23 (70)	– 8,98	– 8,87
Noretinodrel	Vrh	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Dno	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hillov nagib	– 1,04	0,21 (68)	– 1,09	– 0,99
	LogIC ₅₀	– 6,19	0,40 (68)	– 6,29	– 6,10
Noretindron ^(c)	Vrh	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Dno	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillov nagib	– 1,18	0,32 (23)	– 1,31	– 1,04
	LogIC ₅₀	– 6,01	0,54 (23)	– 6,25	– 5,78

^(a) Srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD) s veličinom uzorka (n) izračunani su upotrebom procjena prilagođene krivulje (Hillova jednadžba s četiri parametra) za kontrolne cikluse provedene u četiri laboratorija tijekom validacijske studije (vidjeti Prilog N literaturi pod 2.).

^(b) Intervali pouzdanosti od 95 % navedeni su kao smjernica za kriterije prihvatljivosti.

^(c) U validacijskoj studiji nije bilo obvezno ispitivanje noretindrona za podzadatak 4 (vidjeti literaturu pod 2., vidjeti podzadatak 4.). Stoga su srednje vrijednosti $\pm$ standardne devijacije (n) izračunane upotrebom procjena prilagodbe krivulje (Hillova jednadžba s četiri parametra) za kontrolne cikluse provedene u dva laboratorija. Raspon za IC₅₀ ovisit će o vrijednosti Kd pripravka receptora i koncentraciji radioaktivno obilježenih liganada u svakom laboratoriju. Bit će prihvatljiva odgovarajuća prilagodba za raspon vrijednosti IC₅₀ na temelju uvjeta korištenih za provedbu testa.

Dokazivanje osposobljenosti laboratorija

10. Vidjeti stavke 17. i 18. te tablicu 2. u odjeljku „**SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER**” ove ispitne metode. Svaki test (zasićenje i konkurentsko vezivanje) treba se sastojati od tri neovisna ciklusa (tj. sa svježim razrjeđivanjima receptora, kemikalija i reagensa) provedena na različite dane te svaki ciklus treba sadržavati tri ponavljanja.

Utvrđivanje koncentracije receptora (hrER α)

11. Koncentracija aktivnih receptora malo se razlikuje s obzirom na šaržu i uvjete skladištenja. Zato treba utvrditi koncentraciju aktivnih receptora koja je dobivena od dobavljača. Tako će se dobiti primjerena koncentracija aktivnih receptora u trenutku provedbe ciklusa.
12. Nominalne koncentracije od 0,1, 0,2, 0,4 i 0,6 nM receptora treba inkubirati bez (ukupno vezivanje) i s (nespecifično vezivanje) 1 μ M neobilježenog estradiola u uvjetima koji odgovaraju konkurentskom vezivanju (tj. 0,5 nM [3 H]-estradiola). Specifično vezivanje, izračunano kao razlika ukupnog i nespecifičnog vezivanja, grafički se prikazuje u ovisnosti o nominalnoj koncentraciji receptora. Koncentracija receptora koja pokaže specifične vrijednosti vezivanja koje odgovaraju 40 % dodane radioaktivne oznake povezana je s odgovarajućom koncentracijom receptora i tu koncentraciju receptora treba upotrebljavati za pokuse vezivanja do zasićenja i konkurentskog vezivanja. Konačna koncentracija receptora hrER od 0,2 nM često će ispunjavati taj uvjet.
13. Ako se kriterij od 40 % ne može ispuniti u više navrata, treba provjeriti plan pokusa kako bi se utvrdile potencijalne pogreške. Neuspjeh u ispunjavanju kriterija od 40 % može biti znak toga da u rekombinantnoj šarži ima vrlo malo aktivnih receptora i zatim treba razmotriti upotrebu druge šarže receptora.

Test zasićenja

14. Osam povećavajućih koncentracija [3 H]17 β -estradiola treba procijeniti u tri ponavljanja, u sljedeća tri uvjeta (vidjeti tablicu 2.):
 - a. bez neobilježenog 17 β -estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. To je utvrđivanje ukupnog vezivanja mjerenjem radioaktivnosti u jažicama u kojima se nalazi samo [3 H]17 β -estradiol;
 - b. u prisutnosti koncentracije neobilježenog 17 β -estradiola koja je 2000 veća od koncentracije obilježenog 17 β -estradiola i u prisutnosti estrogenskog receptora. Namjera je ovog uvjeta zasititi aktivna vezna mjesta neobilježenim 17 β -estradiolom te mjerenjem radioaktivnosti u jažicama utvrditi nespecifično vezivanje. Sav radioaktivno obilježeni estradiol koji je preostao koji se može vezati na receptor smatra se vezanim na nespecifično mjesto jer bi neobilježeni estradiol trebao biti prisutan u tako visokoj koncentraciji da se veže na sva dostupna specifična mjesta na receptoru;
 - c. bez neobilježenog 17 β -estradiola i bez estrogenskog receptora (utvrđivanje ukupne radioaktivnosti).

Priprema otopina [3 H]-17 β -estradiola, neobilježenog 17 β -estradiola i receptora hrER α

15. Otopinu 40 nM [3 H]-17 β -estradiola treba pripremiti iz 1 μ M glavne otopine [3 H]-17 β -estradiola u DMSO-u, dodavanjem DMSO-a (kako bi se pripremilo 200 nM) i testnog pufera na sobnoj temperaturi (kako bi se pripremilo 40 nM). Upotrebom te otopine od 40 nM priprema se niz razrjeđivanja [3 H]-17 β -estradiola, u rasponu od 0,313 nM do 40 nM s testnim puferom na sobnoj temperaturi (kako je prikazano u retku 12 tablice 2.). Konačne koncentracije u testu, u rasponu od 0,0313 do 4,0 nM, dobit će se dodavanjem 10 μ l tih otopina odgovarajućim testnim jažicama na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica (vidjeti tablice 2. i 3.). Priprema testnog pufera, izračun izvorne glavne otopine [3 H]-17 β -estradiola na temelju njezine specifične aktivnosti, priprema razrjeđivanja te utvrđivanje koncentracija posebno su opisani u protokolu za CERL-jev test (2.).

16. Razrjeđivanja neobilježenih otopina 17 β -estradiola treba pripremiti iz 1 nM glavne otopine 17 β -estradiola dodavanjem testnog pufera kako bi se dobilo osam povećavajućih koncentracija koje su prvotno u rasponu od 0,625 μ M do 80 μ M. Konačne koncentracije u testu, u rasponu od 0,0625 do 8 μ M, dobit će se dodavanjem 10 μ l tih otopina odgovarajućim testnim jažicama na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica namijenjenima za mjerenje nespecifičnog vezivanja (vidjeti tablice 2. i 3.). Priprema razrjeđivanja neobilježenog 17 β -estradiola posebno je opisana u protokolu za CERI-jev test (2.).
17. Treba upotrebljavati koncentraciju receptora koja daje specifično vezivanje od 40 ± 10 % (vidjeti stavke 12. i 13.). Otopinu receptora hrERa treba pripremiti s vrlo hladnim testnim puferom neposredno prije upotrebe, tj. nakon što se pripreme sve jažice za ukupno vezivanje, nespecifično vezivanje i samo radioaktivno obilježeni ligand.
18. Mikrotitracijske ploče s 96 jažica pripremaju se kako je prikazano u tablici 2., s tri ponavljanja po koncentraciji [3 H]-17 β -estradiola. Raspored volumena [3 H]-17 β -estradiola, neobilježenog 17 β -estradiola, pufera i receptora prikazan je u tablici 3.

Tablica 2

Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test vezivanja do zasićenja

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Za mjerenje TB-a			Za mjerenje NSB-a			Za utvrđivanje samo radioaktivno obilježenog liganda				Razrjeđivanja neobilježenog E2 za stupce ploče 4–6	Razrjeđivanja [3 H]E2 za stupce ploče 1–9
A	0,0313 nM [3 H] E2+ ER			0,0313 nM [3 H] E2+ 0,0625 μ M E2+ ER			0,0313 nM				0,625 μ M	0,313 nM
B	0,0625 nM [3 H] E2+ ER			0,0625 nM [3 H] E2+ 0,125 μ M E2+ ER			0,0625 nM				1,25 μ M	0,625 nM
C	0,125 nM [3 H] E2+ ER			0,125 nM [3 H] E2+ 0,25 μ M E2+ ER			0,125 nM				2,5 μ M	1,25 nM
D	0,250 nM [3 H] E2+ ER			0,250 nM [3 H] E2+ 0,5 μ M E2+ ER			0,250 nM				5 μ M	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [3 H] E2+ 1 μ M E2+ ER			0,50 nM				10 μ M	5 nM
F	1,00 nM [3 H] E2+ ER			1,00 nM [3 H] E2+ 2 μ M E2+ ER			1,00 nM				20 μ M	10 nM
G	2,00 nM [3 H] E2+ ER			2,00 nM [3 H] E2+ 4 μ M E2+ ER			2,00 nM				40 μ M	20 nM
H	4,00 nM [3 H] E2+ ER			4,00 nM [3 H] E2+ 8 μ M E2+ ER			4,00 nM				80 μ M	40 nM

TB: ukupno vezivanje

NSB: nespecifično vezivanje

[3 H] E2: [3 H]17 β -estradiolE2: neobilježeni 17 β -estradiol

(*) Koncentracije koje su ovdje navedene konačne su koncentracije u svakoj jažici.

(**) Razrjeđivanja neobilježenog E2 i [3 H]E2 mogu se pripremiti na različitim pločama.

Tablica 3

Volumeni reagensa za mikrotitracijsku ploču za zasićenje

Broj retka		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Koraci pripreme		Jažice za TB			Jažice za NSB		Samo radioaktivno obilježeni ligand			
Volumen sastavnica za prethodne reakcijske jažice i redosljed dodavanja	Pufer	60 µl			50 µl		90 µl			
	neobilježeni E2 iz retka 11 u tablici 2.	–			10 µl		–			
	[³ H]E2 iz retka 12 u tablici 2.	10 µl			10 µl		10 µl			
	hrERα	30 µl			30 µl		–			
Ukupni reakcijski volumen		100 µl			100 µl		100 µl			
Inkubacija		REAKCIJA NAKON DVA SATA INKUBACIJE						Kvantifikacija radioaktivnosti odmah nakon pripreme. Bez inkubacije		
Tretiranje 0,4-postotnim DCC-om		Da			Da		Ne			
Volumen 0,4-postotnog DCC-a		100 µl			100 µl		–			
Filtriranje		Da			Da		Ne			
MJERENJE DPMS-a										
Kvantifikacijski volumen dodan scintilacijskom koktelu		100 µl (**)			100 µl (**)		50 µl			

(*) Ako se za mjerenje raspada u minuti upotrebljava tekućinski scintilacijski brojač (LSC) za mikrotitracijske ploče, samo radioaktivno obilježeni ligand nije primjereno pripremati na istoj testnoj ploči na kojoj se nalaze i jažice za TB i NSB. Samo radioaktivno obilježeni ligand treba pripremiti na drugoj ploči.

(**) Ako se za odvajanje DCC-a upotrebljava centrifugiranje, LSC-om treba izmjeriti 50 µl supernatanta kako bi se izbjegla kontaminacija DCC-a.

19. Mikrotitracijske ploče testa za utvrđivanje ukupnog i nespecifičnog vezivanja treba inkubirati dva sata na sobnoj temperaturi (od 22 °C do 28 °C).

Mjerenje [³H]-17β-estradiola koji se vezao na receptore hrERα

20. Nakon dvosatnog razdoblja inkubacije [³H]-17β-estradiol vezan na receptore hrERα treba odvojiti od slobodnog [³H]-17β-estradiola tako da se u jažice doda 100 µl 0,4-postotne vrlo hladne suspenzije DCC-a. Ploče zatim treba staviti na led deset minuta, a reakcijsku smjesu i suspenziju DCC-a filtrirati prenošenjem na filtar mikrotitracijske ploče kako bi se uklonio DCC. Zatim 100 µl filtrata treba dodati scintilacijskoj tekućini u bočice LSC-a za utvrđivanje raspada u minuti (dpm) po bočici brojenjem metodom tekućinske scintilacije.

21. Umjesto toga, ako nije dostupan mikrotitracijski filtar, DCC se može ukloniti centrifugiranjem. Zatim vrlo oprezno treba uzeti 50 µl supernatanta koji sadržava [³H]-17β-estradiol vezan na receptor hrERα kako bi se izbjegla bilo kakva kontaminacija jažica dodirivanjem DCC-a i to se treba upotrijebiti za brojenje scintilacijom.

22. Uvjet sa samo radioaktivno obilježenim ligandom upotrebljava se za utvrđivanje raspada u minuti (dpm) [^3H]-17 β -estradiola dodanog u testne jažice. Radioaktivnost treba kvantificirati odmah nakon pripreme. Te jažice ne treba inkubirati ni tretirati suspenzijom DCC-a, već se njihov sadržaj treba izravno dodati scintilacijskoj tekućini. Te mjere pokazuju koliko je [^3H]-17 β -estradiola u dpm-ovima dodano svakoj skupini jažica za ukupno vezivanje i nespecifično vezivanje.

Test konkurentskog vezivanja

23. Testom konkurentskog vezivanja mjeri se vezivanje jedne koncentracije [^3H]-17 β -estradiola u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije. Za svaku koncentraciju unutar jednog ciklusa treba upotrijebiti tri istodobna ponovljena uzorka. Osim toga, za svaku ispitanu kemikaliju treba provesti tri neparalelna ciklusa. Test treba provesti na jednoj mikrotitracijskoj ploči s 96 jažica ili više ploča.

Kontrole

24. Pri provedbi testa u svaki pokus istodobno treba uključiti otapalo i kontrole (tj. referentni estrogen, kemikaliju koja se slabo veže i kemikaliju koja se ne veže). Na jednoj ploči tijekom svakog ciklusa treba upotrijebiti cijelu krivulju koncentracija referentnog estrogena i kontrola (tj. kemikalije koja se slabo veže i koja se ne veže). Sve ostale ploče trebaju sadržavati: i. visoku (najveće istiskivanje, tj. približno potpuno istiskivanje radioaktivno obilježenog liganda) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i kemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; ii. kontrolu s otapalom i nespecifično vezivanje, svako u tri ponavljanja. Postupci za pripremu testnog pufera, [^3H]-17 β -estradiola, receptora hrERa i otopina ispitivanih kemikalija detaljno su opisani u protokolu za test CER1 (2.).

Kontrola s otapalom

25. Kontrola s otapalom pokazuje da otapalo nije u interakciji s ispitnim sustavom i mjeri ukupno vezivanje (TB). Poželjno je otapalo DMSO. Umjesto toga, ako najviša koncentracija ispitivane kemikalije nije topljiva u DMSO-u, može se upotrijebiti etanol. Koncentracija DMSO-a u konačnim testnim jažicama treba biti 2,05 % i može se povećati do 2,5 % ako ispitivana kemikalija nije dovoljno topljiva. Ne treba upotrebljavati koncentracije DMSO-a veće od 2,5 % zbog utjecaja većih koncentracija otapala na test. Za ispitivane kemikalije koje nisu topljive u DMSO-u, ali su topljive u etanolu, u testu se može upotrijebiti najviše 2 % etanola bez interferencije.

Kontrola s puferom

26. Kontrola s puferom (BC) ne smije sadržavati ni otapalo ni ispitivanu kemikaliju, ali treba sadržavati sve ostale sastavnice testa. Rezultati kontrole s puferom uspoređuju se s kontrolom s otapalom kako bi se potvrdilo da otapalo koje se upotrebljava ne utječe na ispitni sustav.

Kemikalija koja se jako veže (referentni estrogen)

27. Endogeni je ligand 17 β -estradiol (CAS 50-28-2) i on se veže s velikim afinitetom za estrogenski receptor podvrste alfa. Za svaki test konkurentskog vezivanja na hrERa treba pripremiti standardnu krivulju u kojoj se upotrebljava neobilježeni 17 β -estradiol kako bi se omogućila procjena varijabilnosti pri provedbi testa tijekom vremena u istom laboratoriju. Treba pripremiti osam otopina neobilježenog 17 β -estradiola u DMSO-u i testnom puferu, sa sljedećim konačnim koncentracijama u testnim jažicama koje se trebaju upotrijebiti za standardnu krivulju: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , $10^{-8,5}$, 10^{-9} , $10^{-9,5}$, 10^{-10} , 10^{-11} M. Najviša koncentracija neobilježenog 17 β -estradiola (1 μM) treba služiti kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja. Ova se koncentracija prepoznaje po oznaci „NSB” u tablici 4. iako je ona i dio standardne krivulje.

Kemikalija koja se slabo veže

28. Treba uključiti kemikaliju koja se slabo veže (noretinodrel (CAS 68-23-5) ili alternativno noretindron (CAS 68-22-4)) kako bi se dokazala osjetljivost svakog pokusa i omogućila procjena varijabilnosti pri provedbi testa tijekom vremena. Treba pripremiti osam otopina kemikalije koja se slabo veže u DMSO-u i testnom puferu, sa sljedećim konačnim koncentracijama u testnim jažicama: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6} , $10^{-6,5}$, 10^{-7} , $10^{-7,5}$, 10^{-8} i 10^{-9} M.

Kemikalija koja se ne veže

29. Kao negativnu kontrolu (kemikaliju koja se ne veže) treba upotrebljavati oktil-trietoksisilan (OTES, CAS 2943-75-1). Ona je jamstvo da će se načinom na koji se test provodi otkriti ispitivane kemikalije koje se ne vežu na receptor hrERa. Treba pripremiti osam otopina kemikalije koja se ne veže u DMSO-u i testnom puferu, sa sljedećim konačnim koncentracijama u testnim jažicama: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M. Kao alternativna kemikalija koja se ne veže može se upotrebljavati di-n-butil-ftalat (DBP, CAS 84-72-2), ali se ispituje samo do 10^{-4} M. Pokazalo se da je 10^{-4} M najveća topljivost DBP-a u testu.

Koncentracija receptora hrERa

30. Treba upotrebljavati količinu receptora koja daje specifično vezivanje od $40 \pm 10 \%$ (vidjeti stavke 12. i 13. Dodatka 3.). Otopinu receptora hrERa treba pripremiti razrjeđivanjem funkcionalnog receptora hrERa u vrlo hladnom testnom puferu, neposredno prije upotrebe.

[³H]-17β-estradiol

31. Konačna koncentracija [³H]-17β-estradiola u testnim jažicama treba biti 0,5 nM.

Ispitivane kemikalije

32. U prvom se redu treba ispitati topljivost kako bi se utvrdila granica topljivosti za svaku ispitivanu kemikaliju i utvrdio primjereni raspon koncentracija za upotrebu u protokolu ispitivanja. Granicu topljivosti svake ispitivane kemikalije prvo treba utvrditi u otapalu i zatim potvrditi u uvjetima testa. Konačna koncentracija koja se ispituje u testu ne smije biti veća od 1 mM. Ispitivanje za utvrđivanje raspona uključuje kontrolu s otapalom i najmanje osam log-serijskih razrjeđivanja, počevši od najveće prihvatljive koncentracije (npr. 1 mM ili manje, na temelju granice topljivosti) i uočene prisutnosti zamućenja ili taloga (vidjeti i stavak 35. Dodatka 3.). Kada se utvrdi raspon koncentracija za ispitivanje, ispitivanu kemikaliju treba ispitati upotrebom osam primjereno raspoređenih log koncentracija, kako su utvrđene u prethodnom ispitivanju za utvrđivanje raspona. Ako je potrebno, koncentracije ispitane u drugom i trećem pokusu po potrebi treba dodatno prilagoditi kako bi se bolje opisala krivulja koncentracija – odgovor.
33. Razrjeđivanja ispitivane kemikalije treba pripremiti u odgovarajućem otapalu (vidjeti stavak 25. Dodatka 3.). Ako najviša koncentracija ispitivane kemikalije nije topljiva ni u etanolu ni u DMSO-u te bi dodavanjem još otapala koncentracija otapala u konačnoj epruveti porasla iznad prihvatljivog ograničenja, najviša koncentracija može se smanjiti na sljedeću nižu koncentraciju. U tom se slučaju može dodati dodatna koncentracija na donjem kraju niza koncentracija. Ostale koncentracije u nizu ne smiju se mijenjati.
34. Otopine ispitivane kemikalije treba pažljivo pratiti kada se dodaju u testnu jažicu jer se ispitivana kemikalija može nataložiti nakon dodavanja u testnu jažicu. Podatke za sve jažice koje sadržavaju talog treba isključiti iz prilagođavanja krivulje i treba evidentirati razlog za isključivanje podataka.
35. Ako već postoje informacije iz drugih izvora koje pokazuju $\log(IC_{50})$ ispitivane kemikalije, može biti primjereno geometrijski rasporediti razrjeđivanja bliže očekivanoj vrijednosti $\log(IC_{50})$ (tj. polovine log jedinica). Konačni rezultati trebaju pokazivati dovoljnu raspoređenost koncentracija na obje strane $\log(IC_{50})$, uključujući „vrh” i „dno”, tako da se krivulja vezivanja može primjereno opisati.

Organizacija testne ploče

36. Označene mikrotitracijske ploče treba pripremiti upotrebom inkubacija u šest ponavljanja za kontrolu s otapalom, najviše koncentracije referentnog estrogena (E2) koji služi i kao pokazatelj nespecifičnog vezivanja (NSB), kontrole s puferom, te inkubacije u tri ponavljanja za svaku od osam koncentracija kontrole koja se ne veže (oktil-trietoksisilan), sedam nižih koncentracija za referentni estrogen (E2), osam koncentracija kemikalije koja se slabo veže (noretinodrel ili noretindron) i osam koncentracija svake ispitivane kemikalije (TC). Primjer rasporeda na ploči za cijele krivulje koncentracija referentnog estrogena i kontrola naveden je u tablici 4. u nastavku. Za ispitivanu kemikaliju upotrebljavaju se dodatne mikrotitracijske ploče koje trebaju uključivati kontrole na ploči, tj.: i. visoku (najveće istiskivanje) i srednju (približno IC_{50}) koncentraciju E2 i kemikalije koja se slabo veže u tri ponavljanja; ii. kontrolu s otapalom (kao ukupno vezivanje) i nespecifično vezivanje u šest ponavljanja (tablica 5.). Primjer radnog lista s rasporedom mikrotitracijskih ploča za test konkurentskog vezivanja s tri nepoznate ispitivane kemikalije naveden je u Dodatku 3.3. Koncentracije navedene u radnom listu te u tablicama 4. i 5. odnose se na konačne koncentracije koje se upotrebljavaju u svakoj testnoj jažici. Najveća koncentracija za E2 treba iznositi 1×10^{-7} M, a za kemikaliju koja se slabo veže treba upotrebljavati najvišu koncentraciju koja se upotrebljavala za kemikaliju koja se slabo veže na ploči 1. Laboratorij mora utvrditi koncentraciju IC_{50} na temelju svoje baze podataka o prijašnjim kontrolama. Očekuje se da će ta vrijednost biti slična vrijednosti uočenoj u validacijskim studijama (vidjeti tablicu 1.).

Tablica 4

Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja⁽¹⁾ ⁽²⁾, cijele krivulje koncentracija referentnog estrogena i kontrola (ploča 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Kontrola s puferom i pozitivna kontrola (E2)			Slabo pozitivna kemikalija (Noretinodrel)			Negativna kontrola (OTES)			TB i NSB		
A	Slijepa proba (*)			1 × 10 ⁻⁹ M			1 × 10 ⁻¹⁰ M			TB (kontrola s otapalom) (2,05-postotni DMSO)		
B	E2 (1 × 10 ⁻¹¹ M)			1 × 10 ⁻⁸ M			1 × 10 ⁻⁹ M					
C	E2 (1 × 10 ⁻¹⁰ M)			1 × 10 ^{-7,5} M			1 × 10 ⁻⁸ M			NSB (10 ⁻⁶ M E2)		
D	E2 (1 × 10 ^{-9,5} M)			1 × 10 ⁻⁷ M			1 × 10 ⁻⁷ M					
E	E2 (1 × 10 ⁻⁹ M)			1 × 10 ^{-6,5} M			1 × 10 ⁻⁶ M			Kontrola s puferom		
F	E2 (1 × 10 ^{-8,5} M)			1 × 10 ⁻⁶ M			1 × 10 ⁻⁵ M					
G	E2 (1 × 10 ⁻⁸ M)			1 × 10 ^{-5,5} M			1 × 10 ⁻⁴ M			Slijepa proba (za radioakt.) (**) (za		
H	E2 (1 × 10 ⁻⁷ M)			1 × 10 ^{-4,5} M			1 × 10 ⁻³ M					

⁽¹⁾ Primjer rasporeda za mikrotitracijsku ploču sa standardima koje treba primijeniti u svakom pokusu.

⁽²⁾ Napominje se da se na ovoj mikrotitracijskoj ploči upotrebljavaju razrjeđivanja pripremljena na ploči za razrjeđivanje opisanoj u pogledu standarda u prethodnim odjeljcima.

U ovom se primjeru kao kemikalija koja se slabo veže upotrebljava noretinodrel (NE)

(*) Stvarna slijepa proba, jažica se ne upotrebljava.

(**) Slijepa proba, ne upotrebljava se tijekom inkubacije, ali se upotrebljava za potvrđivanje ukupne dodane radioaktivnosti.

Tablica 5

Raspored na mikrotitracijskoj ploči za test konkurentskog vezivanja, dodatne ploče za ispitivane kemikalije (TC) i kontrole na ploči

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Ispitivana kemikalija 1 (TC-1)			Ispitivana kemikalija 2 (TC-2)			Ispitivana kemikalija 3 (TC-3)			Kontrole		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC ₅₀)		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$ M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC ₅₀)		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (kontrola s otapalom)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

U ovom se primjeru kao kemikalija koja se slabo veže upotrebljava noretinodrel (NE)

Dovršetak testa konkurentskog vezivanja

37. Uz iznimku jažica za ukupno vezivanje i slijepe probe (za radioaktivnost), kako je prikazano u tablici 6., u svaku jažicu treba staviti 50 μ l testnog pufera i pomiješati s 10 μ l kontrole s otapalom, referentnog estrogena (E2), kemikalije koja se slabo veže, kemikalije koja se ne veže ili ispitivanih kemikalija te s 10 μ l otopine [³H]-17 β -estradiola od 5 nM. Zatim se svakoj ploči dodaje 30 μ l vrlo hladne otopine receptora i lagano promiješa. Otopina receptora hrERa trebala bi biti posljednji reagens koji se dodaje. Mikrotitracijske ploče testa treba inkubirati dva sata na sobnoj temperaturi (od 22 do 28 °C).

Tablica 6

Volumen sastavnica testa za test konkurentskog vezivanja na hrER, mikrotitracijske ploče

Koraci pripreme		Osim jažica za TB	Jažice za TB	Slijepa proba (za radioakt.)
Volumen sastavnica za prethodne reakcijske jažice i redoslijed dodavanja	Testni pufer sobne temperature	50 μ l	60 μ l	90 μ l
	Neobilježeni E2, kemikalija koja se slabo veže, kemikalija koja se ne veže, otapalo i ispitivane kemikalije (*)	10 μ l	–	–
	[³ H]-17 β -estradiol koji treba imati konačnu koncentraciju od 0,5 nM (tj. 5 nM)	10 μ l	10 μ l	10 μ l
	Koncentracija receptora hrERa kako je utvrđeno (vidjeti stavke 12. i 13.)	30 μ l	30 μ l	–
Ukupni volumen u svakoj testnoj jažici		100 μ l	100 μ l	100 μ l

(*) Pravilno pripremljeni kako bi se dobila konačna koncentracija u okviru prihvatljive koncentracije otapala

38. Zatim treba kvantificirati [^3H]-17 β -estradiol vezan na receptore hrER α , nakon odvajanja [^3H]-17 β -estradiola vezanog na receptore hrER α od slobodnog [^3H]-17 β -estradiola dodavanjem 100 μl suspenzije vrlo hladnog DCC-a u svaku jažicu, kako je opisano u stavcima od 21. do 23. Dodatka 3. za test vezivanja do zasićenja.
39. Jažice G10–12 i H10–12 (utvrđene kao slijepe probe (za radioaktivnost) u tablici 4.) predstavljaju dpm označenog [^3H] estradiola u 10 μl . Alikvot od 10 μl treba izravno dodati scintilacijskoj tekućini.

Kriteriji prihvatljivosti

Test vezivanja do zasićenja

40. Krivulja specifičnog vezivanja treba dosegnuti plato kako se upotrebljavaju povećavajuće koncentracije [^3H]-17 β -estradiola, što ukazuje na zasićenje receptora hrER α ligandom.
41. Specifično vezivanje pri 0,5 nM [^3H]-17 β -estradiola treba biti unutar prihvatljivog raspona od 30 % do 50 % prosječne izmjerene ukupne radioaktivnosti dodane u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstupanja od tog raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi i treba ponoviti test zasićenja.
42. Iz podataka bi trebala nastati linearna Scatchardova krivulja.
43. Nespecifično vezivanje ne bi trebalo biti preveliko. Vrijednost za nespecifično vezivanje obično bi trebala biti <35 % ukupnog vezivanja. Međutim, omjer povremeno može biti veći od tog ograničenja kada se mjere vrlo niski dpm-ovi za najniže koncentracije ispitano radioaktivno obilježenog 17 β -estradiola.

Test konkurentskog vezivanja

44. Povećavanjem koncentracija neobilježenog 17 β -estradiola trebao bi se istisnuti [^3H]-17 β -estradiol s receptora na način koji je dosljedan konkurentskom vezivanju na jedno mjesto.
45. Vrijednost IC₅₀ za referentni estrogen (tj. 17 β -estradiol) treba biti približno jednaka molarnoj koncentraciji [^3H]-17 β -estradiola uvećanoj za K_d utvrđen u testu vezivanja do zasićenja.
46. Ukupno specifično vezivanje dosljedno bi trebalo biti unutar prihvatljivog raspona od 40 $\pm$ 10 % ako je prosječna izmjerena koncentracija ukupne radioaktivnosti dodane svakoj jažici iznosila 0,5 nM u svim ciklusima. Prihvatljiva su povremena manja odstupanja od tog raspona, ali ako su ciklusi dosljedno izvan tog raspona ili je određeni ciklus znatno izvan tog raspona, koncentraciju proteina treba prilagoditi.
47. Otapalo ne bi smjelo promijeniti osjetljivost ili obnovljivost testa. Rezultati kontrole s otapalom (jažice TB) uspoređuju se s kontrolom s puferom kako bi se potvrdilo da otapalo koje se upotrebljava ne utječe na ispitni sustav. Ako otapalo ne utječe na test, rezultati TB-a i kontrole s puferom trebaju biti usporedivi.
48. Kemikalija koja se ne veže ne bi trebala istisnuti više od 25 % [^3H]-17 β -estradiola s receptora hrER α ako se ispituje do 10⁻³ M (OTES) ili 10⁻⁴ M (DBP).

49. Kriteriji uspješnosti razvijeni su za referentni estrogen i dvije kemikalije koje se slabo vežu (npr. noretinodrel, noretindron) upotrebom podataka iz validacijske studije za CERI-jev test vezivanja na hrER (Prilog N literaturi pod 2.). Intervali pouzdanosti od 95 % navode se za srednju vrijednost $\pm$ SD (n) svih kontrolnih ciklusa u sva četiri laboratorija koja su sudjelovala u validacijskoj studiji. Intervali pouzdanosti od 95 % izračunani su za parametre prilagođene krivulje (tj. vrh, dno, Hillov nagib, $\log IC_{50}$) za referentni estrogen i kemikalije koje se slabo vežu te za $\log_{10}$ RBA kemikalija koje se slabo vežu u odnosu na referentni estrogen. U tablici 1. navedeni su očekivani rasponi za parametre prilagođene krivulje koji se mogu upotrebljavati kao kriteriji uspješnosti. U praksi se raspon vrijednosti IC_{50} može neznatno razlikovati ovisno o eksperimentalno izvedenoj vrijednosti Kd pripravka receptora i koncentraciji liganda upotrijebljenoj u testu.
50. Za parametre prilagođene krivulje za ispitivane kemikalije nisu razvijeni kriteriji uspješnosti zbog velikog raspona postojećih potencijalnih ispitivanih kemikalija i varijacije u mogućim afinitetima i ishodima (npr. cijela krivulja, djelomična krivulja, bez prilagođavanja krivulje). Međutim, pri pregledu rezultata iz svakog ciklusa za ispitivanu kemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu. Treba upotrijebiti dovoljan raspon koncentracija ispitivane kemikalije kako bi se jasno utvrdio vrh (npr. od 90 do 100 % vezivanja) konkurentne krivulje. Varijabilnost među ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije te među tri neistodobna ciklusa treba biti razumna i znanstveno opravdana. Kontrole iz svakog ciklusa za ispitivanu kemikaliju trebale bi se približiti mjerilima uspješnosti koja su navedena za ovaj CERI-jev test i biti dosljedne podacima o prijašnjim kontrolama iz svakog odgovarajućeg laboratorija.

ANALIZA PODATAKA

Test vezivanja do zasićenja

51. Mjere se i ukupno i nespecifično vezivanje. Iz tih se vrijednosti računa specifično vezivanje povećavajućih koncentracija [3 H]-17 β -estradiola u uvjetima ravnoteže tako da se nespecifično vezivanje oduzme od ukupnoga. Grafikon specifičnog vezivanja u odnosu na koncentraciju [3 H]-17 β -estradiola treba dosegnuti plato za najveće specifično vezivanje koje ukazuje na zasićenje receptora hrERa [3 H]-17 β -estradiolom. Osim toga, analizom podataka treba evidentirati vezivanje [3 H]-17 β -estradiola na jedno vezno mjesto s velikim afinitetom. Nespecifično, ukupno i specifično vezivanje treba prikazati na krivulji vezivanja do zasićenja. Za daljnju analizu tih podataka treba upotrijebiti nelinearnu regresijsku analizu (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.), s konačnim prikazom podataka u obliku Scatchardove krivulje.
52. Analizom podataka treba utvrditi Bmax i Kd samo iz podataka o ukupnom vezivanju uz pretpostavku da je nespecifično vezivanje linearno, osim ako se obrazloži upotreba druge metode. Osim toga, pri utvrđivanju najbolje prilagodbe treba upotrijebiti temeljitu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji odabir. Treba navesti metodu odabranu za temeljitu regresiju. Kod utvrđivanja vrijednosti Bmax i Kd iz podataka o vezivanju do zasićenja uvijek treba primijeniti ispravak za potrošnju liganada (npr. upotrebom Swillensove metode iz 1995.).

Test konkurentskog vezivanja

53. Krivulja konkurentskog vezivanja grafički se prikazuje kao specifično vezivanje [3 H]-17 β -estradiola u odnosu na koncentraciju ($\log_{10}$ jedinice) konkurenta. Koncentracija ispitivane kemikalije koja inhibira 50 % najvećeg specifičnog vezivanja [3 H]-17 β -estradiola čini vrijednost IC_{50} .
54. Procjene za vrijednosti $\log(IC_{50})$ za pozitivne kontrole (npr. referentni estrogen i kemikalija koja se slabo veže) treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krivulje kako bi se prilagodila Hillova jednadžba s četiri parametra (npr. BioSoft; McPherson, 1985.; Motulsky, 1995.). Vrh, dno, nagib i $\log(IC_{50})$ obično ne bi trebalo ograničavati pri prilagođavanju tih krivulja. Pri utvrđivanju najbolje prilagodbe treba upotrijebiti temeljitu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji odabir. Ne treba primijeniti ispravak za potrošnju liganada. Nakon početne analize svaku krivulju vezivanja treba pregledati kako bi se osigurala odgovarajuća prilagodba modelu. Relativni afinitet vezivanja (RBA) za kemikaliju koja se slabo veže treba izračunati kao postotak $\log(IC_{50})$ za kemikaliju koja se slabo veže u odnosu na $\log(IC_{50})$ za 17 β -estradiol. Rezultate iz pozitivnih kontrola i kontrola s kemikalijama koje se ne vežu treba procijeniti upotrebom kriterija uspješnosti testa iz stavaka od 44. do 49. ovog Dodatka 3.

55. Podatke za sve ispitivane kemikalije treba analizirati upotrebom stupnjevito pristupa kako bi se osiguralo da su podaci primjereno analizirani i da je svaka krivulja konkurentskog vezivanja pravilno razvrstana. Preporučuje se da se svaki ciklus za ispitivanu kemikaliju prvo podvrgne standardiziranoj analizi podataka koja je identična analizi upotrijebljenoj za referentni estrogen i kontrole kemikalije koja se slabo veže (vidjeti stavak 54. ovog Dodatka 3.). Kada se to dovrši, treba izvršiti tehnički pregled parametara prilagođene krivulje i vizualni pregled mjere u kojoj podaci odgovaraju izrađenoj krivulji konkurentskog vezivanja za svaki ciklus. Tijekom tog tehničkog pregleda dobar pokazatelj toga da su test i analiza podataka pravilno provedeni uključuju opažanje smanjenja postotka specifično vezanog [³H]-17β-estradiola koje ovisi o koncentraciji, malu varijabilnost među tehničkim ponavljanjima pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije i dosljednost u parametrima prilagodbe između tri ciklusa.

Tumačenje podataka

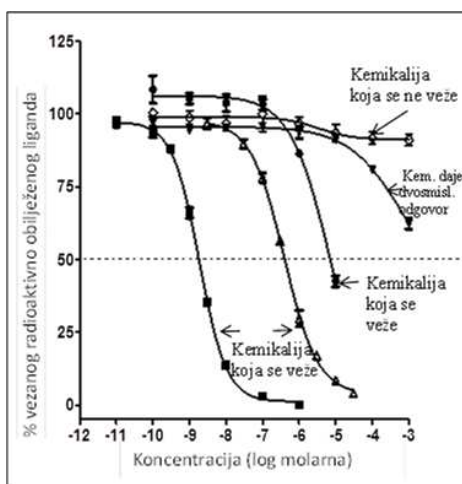
56. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se kemikalijom koja se veže na receptor hrERα ako se krivulja vezivanja može prilagoditi te je najniža točka na krivulji odgovora u rasponu podataka manja od 50 % (slika 1.).
57. Pod uvjetom da su ispunjeni svi kriteriji prihvatljivosti, ispitivana kemikalija smatra se kemikalijom koja se ne veže na receptor hrERα:
- ako se krivulja vezivanja može prilagoditi i ako je najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora u rasponu podataka veća od 75 %, ili
 - ako se krivulja vezivanja ne može prilagoditi i ako je najniži neizgladeni prosječni postotak vezivanja među skupinama koncentracija u podacima veći od 75 %.
58. Smatra se da ispitivane kemikalije daju dvosmislen odgovor ako se ne ispuni nijedan od prethodno navedenih uvjeta (npr. najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

Tablica 7

Kriteriji za dodjelu razvrstavanja na temelju krivulje konkurentskog vezivanja za ispitivanu kemikaliju

Razvrstavanje	Kriteriji
Kemikalija koja se veže ^a	Može se prilagoditi krivulja vezivanja. Najniža točka na krivulji odgovora u rasponu podataka manja je od 50 %.
Kemikalija koja se ne veže ^b	Ako se krivulja vezivanja može prilagoditi, najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora u rasponu podataka veća je od 75 %. Ako se krivulja vezivanja ne može prilagoditi, najniži neizgladeni prosječni postotak vezivanja među skupinama koncentracija u podacima veći je od 75 %.
Daje dvosmislen odgovor ^c	Bilo koji ciklus koji se može ispitati, a nije ni kemikalija koja se veže ni koja se ne veže (npr. najniža točka na prilagođenoj krivulji odgovora nalazi se između 76 i 51 %).

Slika 1

Primjeri razvrstavanja ispitivanih kemikalija upotrebom krivulje konkurentskog vezivanja

59. Višestruki ciklusi koji se provedu u laboratoriju za ispitivanu kemikaliju kombiniraju se dodjeljivanjem numeričkih vrijednosti svakom ciklusu i određivanjem prosjeka svih ciklusa kako je prikazano u tablici 8. Rezultati za kombinirane cikluse u svakom laboratoriju uspoređuju se s očekivanim razvrstavanjem za svaku ispitivanu kemikaliju.

Tablica 8

Metoda za razvrstavanje ispitivane kemikalije upotrebom višestrukih ciklusa unutar laboratorija

Za dodjelu vrijednosti svakom ciklusu:	
Razvrstavanje	Brojčana vrijednost
Kemikalija koja se veže	2
Daje dvosmislen odgovor	1
Kemikalija koja se ne veže	0
Za razvrstavanje prosječne brojčane vrijednosti u svim ciklusima:	
Razvrstavanje	Brojčana vrijednost
Kemikalija koja se veže	Prosječno $\geq 1,5$
Daje dvosmislen odgovor	$0,5 \leq \text{prosječno} < 1,5$
Kemikalija koja se ne veže	Prosječno $< 0,5$

IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

60. Vidjeti stavak 24. u odjeljku „SASTAVNICE TESTA VEZIVANJA NA hrER” ove ispitne metode.

Dodatak 3.1.

POPIS TERMINA

[³H]E2: 17β-estradiol radioaktivno obilježen tricijem.

DCC: ugljen premazan dekstranom.

E2: neobilježeni 17β-estradiol (inertni).

Testni pufer: 10 mM Tris-HCl, pH-vrijednosti 7,4, s 1 mM EDTA-e, 1 mM EGTA-e, 1 mM NaVO₃, 10 % glicerola, 0,2 mM leupeptina, 1 mM ditiotreitola i 10 mg/ml goveđeg serumskog albumina.

hrERα: ljudski rekombinantni estrogenski receptor alfa (domena vezivanja liganda).

Ponavljanje: jedna od više jažica s istim sadržajem u istoj koncentraciji koje se ispituju istodobno u istom ciklusu. U ovom se protokolu svaka koncentracija ispitivane kemikalije ispituje u tri ponavljanja; drugim riječima, tri se ponavljanja ispituju istovremeno pri svakoj koncentraciji ispitivane kemikalije.

Ciklus: cijeli skup jažica s istodobno provedenim testovima na mikrotitracijskoj ploči koji daje sve informacije potrebne za opis vezivanja ispitivane kemikalije na receptor hrERα (odnosno ukupni [³H]-17β-estradiol dodan testnoj jažici, najveće vezivanje [³H]-17β-estradiola na receptore hrERα, nespecifično vezivanje i ukupno vezivanje pri različitim koncentracijama ispitivane kemikalije). Ciklus se može sastojati od samo jedne testne jažice (tj. ponovljeni uzorak) po koncentraciji, ali zbog toga što se ovim protokolom zahtijeva ispitivanje u tri ponavljanja, jedan se ciklus sastoji od tri testne jažice po koncentraciji. Osim toga, ovim se protokolom zahtijevaju tri neovisna (tj. neistodobna) ciklusa po kemikaliji.

Dodatak 3.2.

RASPORED JAŽICA ZA TEST KONKURENTSKOG VEZIVANJA

Ploča	Položaj	Ponavljjanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	A1	1	slijepa proba	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	slijepa proba	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	slijepa proba	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	neobilježeni E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	neobilježeni E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	neobilježeni E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	neobilježeni E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	neobilježeni E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	neobilježeni E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	neobilježeni E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	neobilježeni E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	D3	3	neobilježeni E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	neobilježeni E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	neobilježeni E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	neobilježeni E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	neobilježeni E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	neobilježeni E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	neobilježeni E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	neobilježeni E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	neobilježeni E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	neobilježeni E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	neobilježeni E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	neobilježeni E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	neobilježeni E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	A4	1	noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8D-BP7	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	ukupno vezivanja	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	ukupno vezivanja	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	ukupno vezivanja	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	ukupno vezivanja	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	B11	5	ukupno veziva-nje	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	ukupno veziva-nje	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	neob. E2 (viso-ki)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	neob. E2 (viso-ki)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	neob. E2 (viso-ki)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	neob. E2 (viso-ki)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	neob. E2 (viso-ki)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	neob. E2 (viso-ki)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	kontr. s pufe-rom	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	kontr. s pufe-rom	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	kontr. s pufe-rom	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	kontr. s pufe-rom	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	kontr. s pufe-rom	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	kontr. s pufe-rom	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	sl. proba (za rad.)	rad- ioa- kt.	H1	—	90	—	10	—	100	—

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
S	G11 (*)	2	sl. proba (za rad.)	rad-ioa-kt.	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	sl. proba (za rad.)	rad-ioa-kt.	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	sl. proba (za rad.)	rad-ioa-kt.	H4	—	90	—	10	—	100	—
S	H11 (*)	5	sl. proba (za rad.)	rad-ioa-kt.	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	sl. proba (za rad.)	rad-ioa-kt.	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	nepoznato 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	nepoznato 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	nepoznato 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	nepoznato 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	nepoznato 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	nepoznato 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	nepoznato 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	nepoznato 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	nepoznato 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	D1	1	nepoznato 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	nepoznato 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	nepoznato 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	nepoznato 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	nepoznato 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	nepoznato 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	nepoznato 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	nepoznato 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	nepoznato 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	nepoznato 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	nepoznato 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	nepoznato 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	nepoznato 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	nepoznato 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	H3	3	nepoznato 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	nepoznato 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	nepoznato 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	nepoznato 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	nepoznato 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	nepoznato 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	nepoznato 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	nepoznato 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	nepoznato 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	nepoznato 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	nepoznato 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	nepoznato 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	nepoznato 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	nepoznato 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	E5	2	nepoznato 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	nepoznato 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	nepoznato 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	nepoznato 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	nepoznato 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	nepoznato 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	nepoznato 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	nepoznato 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	nepoznato 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	nepoznato 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	nepoznato 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	nepoznato 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	nepoznato 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	nepoznato 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	B7	1	nepoznato 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	nepoznato 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	nepoznato 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	nepoznato 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	nepoznato 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	nepoznato 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	nepoznato 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	nepoznato 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	nepoznato 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	nepoznato 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	nepoznato 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	nepoznato 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	nepoznato 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	nepoznato 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	F9	3	nepoznato 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	nepoznato 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	nepoznato 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	nepoznato 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	nepoznato 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	nepoznato 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	nepoznato 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	kontr. E2 (max)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	kontr. E2 (max)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	kontr. E2 (max)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	kontr. E2 (IC ₅₀)	S	E2IC501	E2IC ₅₀ x- 10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀
P1	B11	2	kontr. E2 (IC ₅₀)	S	E2IC502	E2IC ₅₀ x- 10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀
P1	B12	3	kontr. E2 (IC ₅₀)	S	E2IC503	E2IC ₅₀ x- 10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	C10	1	kontr. NE (max)	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	kontr. NE (max)	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	kontr. NE (max)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	kontr. NE (IC ₅₀)	S	NEIC501	NEIC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	D11	2	kontr. NE (IC ₅₀)	S	NEIC502	NEIC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	D12	3	kontr. NE (IC ₅₀)	S	NEIC503	NEIC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	E10	1	neob. E2 (viso-ki)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	neob. E2 (viso-ki)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	neob. E2 (viso-ki)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	neob. E2 (viso-ki)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	neob. E2 (viso-ki)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	neob. E2 (viso-ki)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Ploča	Položaj	Ponavljanje	Vrsta jažice	Šifra jažice	Šifra koncentracije	Poč. konc. konkurenta (M)	Glavni hrER (μl)	Vol. pufera (μl)	Vol. obilj. (rad. obilj. E2) (μl)	Vol. s ploče za razrj. (μl)	Konačni volumen (μl)	Konačna koncentracija konkurenta (M)
P1	G10	1	ukupno veziva- nje	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	ukupno veziva- nje	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	ukupno veziva- nje	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	ukupno veziva- nje	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	ukupno veziva- nje	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	ukupno veziva- nje	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Napominje se da su „radioaktivne” jažice prazne tijekom inkubacije. Dodaje se 10 μl samo za brojenje scintilacijom.

Dodatak 4.

RAZMATRANJA ZA ANALIZU PODATAKA IZ TESTA KONKURENTSKOG VEZIVANJA NA hrER

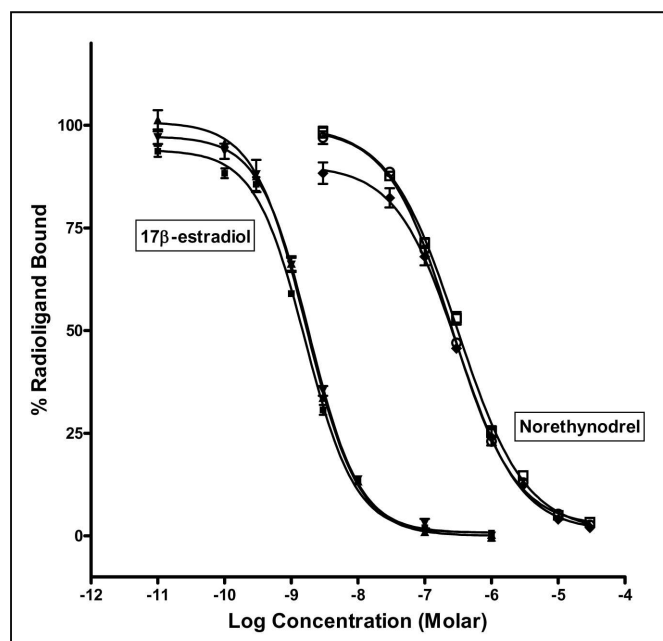
1. Testom konkurentskog vezivanja na hrER α mjeri se vezivanje jedne koncentracije [3 H]-17 β -estradiola u prisutnosti povećavajućih koncentracija ispitivane kemikalije. Krivulja konkurentskog vezivanja grafički se prikazuje kao specifično vezivanje [3 H]-17 β -estradiola u odnosu na koncentraciju (log₁₀ jedinice) konkurenta. Koncentracija ispitivane kemikalije koja inhibira 50 % najvećeg specifičnog vezivanja [3 H]-17 β -estradiola čini IC₅₀.

Analiza podataka za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže (1.)

2. Podaci iz kontrolnih ciklusa transformiraju se (tj. postotak specifičnog vezivanja [3 H]-17 β -estradiola i log koncentracija kontrolne kemikalije) radi daljnje analize. Procjene za vrijednosti log(IC₅₀) za pozitivne kontrole (npr. referentni estrogen i kemikalija koja se slabo veže) treba utvrditi upotrebom primjerenog softvera za nelinearno prilagođavanje krivulje kako bi se prilagodila Hillova jednadžba s četiri parametra (npr. BioSoft; GraphPad Prism) (2.). Vrh, dno, nagib i log(IC₅₀) obično se mogu ostaviti neograničenima pri prilagođavanju tih krivulja. Pri utvrđivanju najbolje prilagodbe treba upotrijebiti temeljitu regresiju osim ako se obrazloži drugačiji odabir. Treba navesti metodu odabranu za temeljitu regresiju. Za FW i CERI-jev test nije bio potreban ispravak za potrošnju liganada, ali po potrebi može se razmotriti njegova upotreba. Nakon početne analize svaku krivulju vezivanja treba pregledati kako bi se osigurala odgovarajuća prilagodba modelu. Relativni afinitet vezivanja (RBA) za kemikaliju koja se slabo veže može se izračunati kao postotak log (IC₅₀) za kemikaliju koja se slabo veže u odnosu na log (IC₅₀) za 17 β -estradiol. Rezultate za pozitivne kontrole i kontrolu s kemikalijom koja se ne veže treba procijeniti upotrebom kriterija uspješnosti testa i kriterija prihvatljivosti kako je opisano u ovoj ispitnoj metodi (stavak 20.), Dodatku 2. (FW test, stavci od 41. do 51.) i Dodatku 3. (CERI-jev test, stavci od 41. do 51.). Primjeri tri ciklusa za referentni estrogen i kemikaliju koja se slabo veže prikazani su na slici 1.

Slika 1.

Primjeri krivulja konkurentskog vezivanja za referentni estrogen i kontrolnu kemikaliju koja se slabo veže

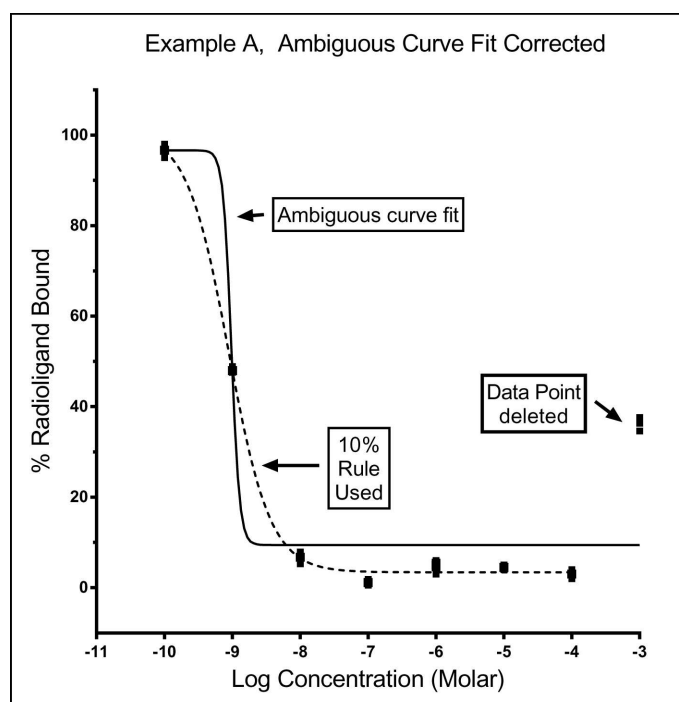


Analiza podataka za ispitivane kemikalije

3. Podatke za sve ispitivane kemikalije treba analizirati upotrebom stupnjevito pristupa kako bi se osiguralo da su podaci primjereno analizirani i da je svaka krivulja konkurentskog vezivanja pravilno razvrstana. Svaki ciklus za ispitivanu kemikaliju prvo treba podvrgnuti standardiziranoj analizi podataka koja je identična analizi upotrijebljenoj za referentni estrogen i kontrolne kemikalije koje se slabo vežu. Kada se to dovrši, treba izvršiti tehnički pregled parametara prilagođene krivulje i vizualni pregled mjere u kojoj podaci odgovaraju izrađenoj krivulji konkurentskog vezivanja za svaki ciklus. Tijekom tog tehničkog pregleda dobar pokazatelj toga da su test i analiza podataka pravilno provedeni uključuju opažanje smanjenja postotka specifično vezanog [^3H]-17 β -estradiola koje ovisi o koncentraciji, malu varijabilnost među tehničkim ponavljanjima pri svakoj koncentraciji kemikalije i dosljednost u parametrima prilagodbe među tri ciklusa. Pri pregledu rezultata iz svakog ciklusa za ispitivanu kemikaliju treba primijeniti stručnu prosudbu, a podaci upotrijebljeni za razvrstavanje ispitivane kemikalije kao kemikalije koja se veže ili koja se ne veže trebaju biti znanstveno opravdani.
4. Povremeno se mogu pojaviti primjeri podataka za koje je potrebna posebna pozornost kako bi se pravilno analizirali i protumačili podaci o vezivanju na hrER. U prethodnim studijama uočeno je da postoje slučajevi u kojima analiza i tumačenje podataka o konkurentskom vezivanju na receptore mogu biti složeni zbog povećanja postotka specifičnog vezivanja kod ispitivanja kemikalija pri najvišim koncentracijama (slika 2.). To je poznata poteškoća do koje dolazi kod upotrebe protokola za niz testova konkurentskog vezivanja na receptore (3). U tim se slučajevima pri nižim koncentracijama uočava odgovor koji ovisi o koncentraciji, ali kako se koncentracija ispitivane kemikalije približava granici topljivosti prestaje se smanjivati istiskivanje [^3H]-17 β -estradiola. U tim slučajevima podaci za više koncentracije pokazuju da je dosegnuto biološko ograničenje testa. Na primjer, ta je pojava često povezana s netopljivošću kemikalije i taloženjem pri visokim koncentracijama ili može odražavati i prekoračenje sposobnosti ugljena prema-zanog dekstranom da veže slobodni radioaktivno obilježeni ligand tijekom postupka odvajanja pri najvišim koncentracijama kemikalija. Zadržavanje tih podatkovnih točaka tijekom prilagođavanja podataka o konkurentskom vezivanju u sigmoidnu krivulju ponekad može dovesti do pogrešnog razvrstavanja ispitivane kemikalije u pogledu potencijala vezivanja na estrogenski receptor (slika 2.). Kako bi se to izbjeglo, protokol za FW i CERI-jev test vezivanja na hrER uključuje opciju da se iz analize isključe podatkovne točke kod kojih je srednja vrijednost ponovljenih uzoraka za postotak specifično vezanog [^3H]-17 β -estradiola za 10 % ili više veća iznad srednje vrijednosti uočene pri nižoj koncentraciji (to se obično naziva pravilo od 10 %). Ovo se pravilo može upotrijebiti samo jednom za određenu krivulju i mora ostati dovoljno podataka za najmanje šest koncentracija tako da se krivulju može točno razvrstati.

Slika 2.

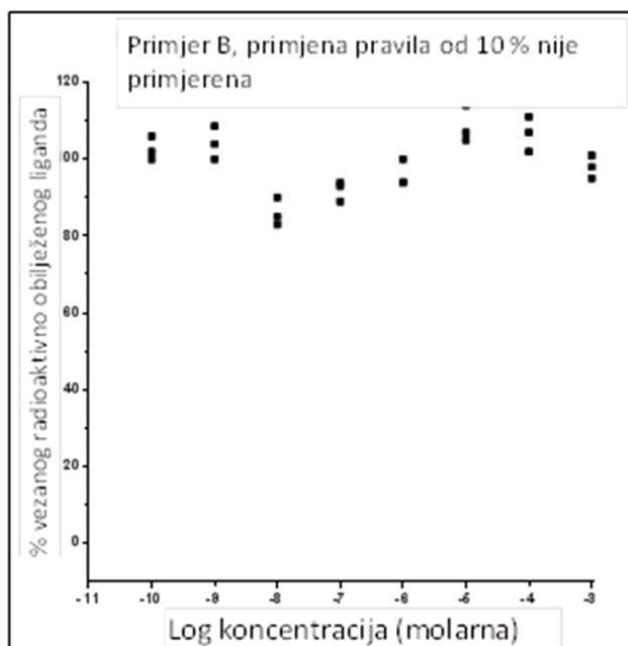
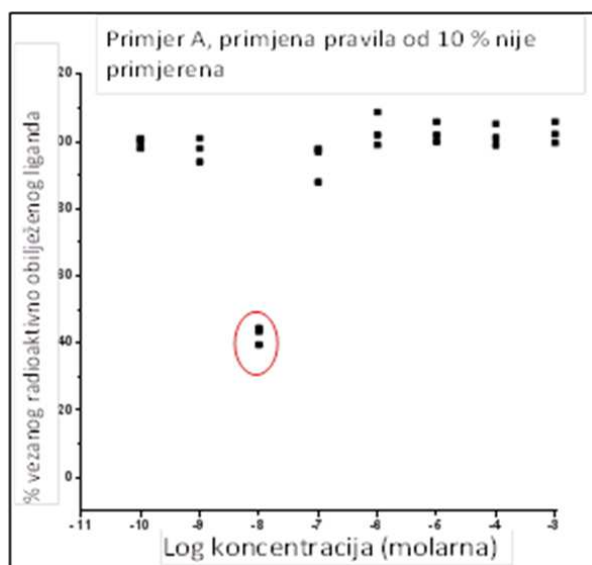
Primjeri, krivulje konkurentskog vezivanja s upotrebom pravila od 10 % i bez te upotrebe



5. Primjerenu upotrebu pravila od 10 % za ispravak tih krivulja treba pažljivo razmotriti i sačuvati za slučajeve u kojima postoji snažna indikacija da je riječ o kemikaliji koja se veže na receptor hrER. Tijekom provedbe pokusa za validacijsku studiju FW testa vezivanja na hrER uočeno je da pravilo od 10 % ponekad ima neplaniranu i nepredviđenu posljedicu. Kemikalije koje nisu bile u interakciji s receptorom (tj. prave kemikalije koje se ne vežu) često su pokazivale varijabilnost u pogledu 100-postotnog vezivanja radioaktivno označenog liganda koja je bila veća od 10 % u cijelom rasponu ispitanih koncentracija. Ako se najniža vrijednost javila pri niskoj koncentraciji, upotrebom pravila od 10 % iz analize bi se potencijalno mogli izbrisati podaci iz svih viših koncentracija iako bi te koncentracije mogle biti korisne u utvrđivanju toga da se kemikalija ne veže. Na slici 3. prikazani su primjeri slučajeva u kojima upotreba pravila od 10 % nije primjerena.

Slika 3.

Primjeri, podaci o konkurentskom vezivanju gdje nije primjerena upotreba pravila od 10 %



Referentni dokumenti

1. OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). The law of mass action, In *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, str. 187.–191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf.
3. Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors. *Toxicological Sci.* 94(1):46.–56.

B.71. IN VITRO TESTOVI IZAZIVANJA PREOSJETLJIVOSTI KOŽE KOJIMA SE ISPITUJE KLJUČNI DOGAĐAJ AKTIVIRANJA DENDRITIČNIH STANICA U PUTU NASTANKA ŠETNOG ISHODA (AOP) IZAZIVANJA PREOSJETLJIVOSTI KOŽE

OPĆI UVOD

Ispitna metoda koja se temelji na ključnom događaju aktiviranja dendritičnih stanica

1. Tvar koja izaziva preosjetljivost kože tvar je koja dovodi do alergijske reakcije nakon dodira s kožom, kako je definirana u Globalno usklađenom sustavu razvrstavanja i označivanja kemikalija Ujedinjenih naroda (UN GHS) (1.) te u Uredbi Europske unije (EU) 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (Uredba o CLP-u) (1). Postoji opća suglasnost o ključnim biološkim događajima koji izazivaju preosjetljivost kože. Postojeće spoznaje o kemijskim i biološkim mehanizmima koji su povezani s izazivanjem preosjetljivosti kože sažete su prikazane u obliku puta nastanka štetnog ishoda (engl. *Adverse Outcome Pathway* – AOP), u okviru OECD-ova programa za AOP (2.), koji se kreće od početnog molekularnog događaja preko međudogađaja do štetnog učinka, tj. alergijskog kontaktnog dermatitisa. U ovom je slučaju početni molekularni događaj (tj. prvi ključni događaj) stvaranje kovalentne veze između elektrofilnih tvari i nukleofilnih središta u proteinima kože. Drugi se ključni događaj u ovom AOP-u odvija u keratinocitima i uključuje upalne odgovore te promjene u genskoj ekspresiji povezane sa specifičnim staničnim signalnim putovima kao što su putovi koji ovise o elementu antioksidacijskog/elektrofilnog odgovora (engl. *antioxidant/electrophile response element*, ARE). Treći je ključni događaj aktiviranje dendritičnih stanica (DC), koje se obično ocjenjuje prema ekspresiji specifičnih staničnih površinskih biljega, kemokina i citokina. Četvrti je ključni događaj aktiviranje i proliferacija T-stanica, koji se neizravno ocjenjuju analizom lokalnih limfnih čvorova na miševima (LLNA) (3.).
2. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 442E (2017.). U njoj se opisuju *in vitro* analize kojima se ispituju mehanizmi opisani u okviru ključnog događaja aktiviranja dendritičnih stanica u AOP-u izazivanja preosjetljivosti kože (2.). Ispitna metoda sastoji se od ispitivanja koja treba primijeniti kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože u skladu sa sustavom UN GHS i Uredbom o CLP-u.

U ovoj su ispitnoj metodi opisana sljedeća ispitivanja:

— test aktiviranja ljudske stanične linije (h-CLAT),

— test aktiviranja stanične linije U937 (U-SENSTM),

— test reporterskog gena interleukin 8 (test IL-8 Luc).

3. Ispitivanja uključena u ovu ispitnu metodu i odgovarajuću smjernicu OECD-a za ispitivanje mogu se razlikovati u odnosu na postupak koji se upotrebljava za dobivanje podataka i izmjerenih očitavanja, ali se mogu neselektivno upotrebljavati za ispunjavanje zahtjeva zemalja u pogledu rezultata ispitivanja o ključnom događaju aktiviranja dendritičnih stanica u AOP-u izazivanja preosjetljivosti kože, uz ostvarivanje koristi od OECD-ova uzajamnog prihvatanja podataka.

(1) Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006, SL L 353/1, 31.12.2008.

Kontekst i načela ispitivanja uključenih u ispitnu metodu koja se temelji na ključnom događaju

4. U procjenama izazivanja preosjetljivosti kože tradicionalno se upotrebljavaju laboratorijske životinje. Klasičnim metodama u kojima se upotrebljavaju zamorci, a to su Magnusson–Kligmanov maksimizacijski test sa zamorcima (GMPT) i Buehlerov test (ispitna metoda B.6. (4.)), ocjenjuje se i faza indukcije i faza elicitacije izazivanja preosjetljivosti kože. Ispitivanjima na miševima, tj. analizom LLNA (ispitna metoda B.42. (3.)) i njezinim dvjema inačicama u kojima se ne upotrebljavaju radioaktivni izotopi, LLNA: DA (ispitna metoda B.50. (5.)) te LLNA: BrdU-ELISA (ispitna metoda B.51. (6.)), ispituje se isključivo odgovor u fazi indukcije i isto su tako prihvaćene jer omogućuju prednost u odnosu na ispitivanja na zamorcima u smislu dobrobiti životinja s objektivnim mjerenjem faze indukcije izazivanja preosjetljivosti kože.
5. Nedavno su prihvaćene *in chemico* i *in vitro* ispitne metode koje se temelje na mehanističkom pristupu kojima se ispituje prvi ključni događaj (ispitna metoda B.59.; test izravne reaktivnosti peptida (7.)) i drugi ključni događaj (ispitna metoda B.60.; test luciferaze ARE-Nrf2 (8.)) u AOP-u izazivanja preosjetljivosti kože kako bi se pridonijelo ocjenjivanju potencijala opasnosti kemikalija da izazovu preosjetljivost kože.
6. Ispitivanjima opisanima u ovoj ispitnoj metodi kvantificira se promjena u ekspresiji staničnih površinskih biljega povezanih s procesom aktiviranja monocita i dendritičnih stanica nakon izlaganja tvarima koje izazivaju preosjetljivost (npr. CD54, CD86) ili promjene ekspresije IL-8, citokina povezanog s aktiviranjem dendritičnih stanica. Postoje izvješća o tome da tvari koje izazivaju preosjetljivost kože induciraju ekspresiju staničnih membranskih biljega, kao što su CD40, CD54, CD80, CD83 i CD86, povrhu induciraju proupalnih citokina, kao što su IL-1 β i TNF- α , i nekoliko kemokina, uključujući IL-8 (CXCL8) i CCL3 (9., 10, 11. i 12.), povezanih s aktiviranjem dendritičnih stanica (2.).
7. Međutim, budući da je aktiviranje dendritičnih stanica samo jedan ključni događaj AOP-a izazivanja preosjetljivosti kože (2. i 13.), informacije dobivene ispitivanjima kojima se mjere samo biljezi aktiviranja dendritičnih stanica možda neće biti dovoljne za donošenje zaključka o prisustvu ili odsustvu potencijala kemikalija da izazovu preosjetljivost kože. Stoga se predlaže da podaci dobiveni ispitivanjima opisanima u ovoj ispitnoj metodi služe kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože (kategorija 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože kada se upotrebljavaju u okviru integriranih pristupa ispitivanju i procjeni (IATA), zajedno s ostalim relevantnim dodatnim informacijama, npr. onima dobivenima *in vitro* analizama kojima se ispituju drugi ključni događaji AOP-a izazivanja preosjetljivosti kože te metodama koje ne uključuju ispitivanje, kao i primjenom analogije s kemijski analognim tvarima (13.). Primjeri upotrebe podataka dobivenih ovim ispitivanjima u okviru utvrđenih pristupa, tj. pristupa standardiziranih i u pogledu skupa korištenih izvora informacija i postupka primijenjenog na podatke kako bi se dobila predviđanja, objavljeni su (13.) i mogu se upotrebljavati kao korisni elementi u okviru IATA-e.
8. Ispitivanja opisana u ovoj ispitnoj metodi ne mogu se upotrijebiti kao jedina metoda za razvrstavanje tvari koje izazivaju preosjetljivost kože u potkategorije 1.A i 1.B kako su definirane u sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u (u slučaju tijela koja primjenjuju te dvije neobavezne potkategorije) ni za predviđanje njihove jakosti pri donošenju odluka o ocjeni sigurnosti. Međutim, ovisno o regulatornom okviru pozitivni rezultati dobiveni ovim metodama mogu se samostalno upotrijebiti za razvrstavanje kemikalije u kategoriju 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u.
9. U ovoj se ispitnoj metodi izraz „ispitivana kemikalija” upotrebljava za označivanje onoga što se ispituje⁽¹⁾ te se ne odnosi na primjenjivost ispitivanja na ispitivanje tvari s jednim sastojkom, tvari s više sastojaka i/ili smjesa. Trenutačno su dostupne ograničene informacije o primjenjivosti ispitivanja na tvari s više sastojaka/smjese (14. i 15.). Unatoč tomu, ispitivanja su tehnički primjenjiva i za ispitivanje tvari s više sastojaka i smjesa. Međutim, prije nego što se ova ispitna metoda primijeni na smjesi radi dobivanja podataka za predviđenu regulatornu svrhu, potrebno je razmotriti mogu li se njome dobiti primjereni rezultati za tu svrhu te ako mogu, zašto⁽²⁾. Ta razmatranja nisu potrebna ako postoji regulatorni zahtjev za ispitivanje smjese. Osim toga, kada se ispituju tvari s više sastojaka ili smjese, trebalo bi razmotriti moguću interferenciju citotoksične komponente s uočenim odgovorima.

⁽¹⁾ U lipnju 2013. na zajedničkom sastanku OECD-a dogovoreno je da bi u novim i ažuriranim smjernicama OECD-a za ispitivanje, kada je to moguće, trebalo dosljednije upotrebljavati termin „ispitivana kemikalija” kojim se opisuje ono što se ispituje.

⁽²⁾ Ova je rečenica predložena i dogovorena na sastanku o WNT-u održanom u travnju 2014.

LITERATURA

1. Ujedinjeni narodi (UN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupno na: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.
2. OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Dostupno na: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
3. Poglavlje B.42. ovog Priloga: Analiza lokalnih limfnih čvorova.
4. Poglavlje B.6. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože.
5. Poglavlje B.50. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože: analiza lokalnih limfnih čvorova: DA.
6. Poglavlje B.51. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože: analiza lokalnih limfnih čvorova: BrdU-ELISA.
7. Poglavlje B.59. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože *in chemico*: test izravne reaktivnosti peptida (*Direct Peptide Reactivity Assay* – DPRA).
8. Poglavlje B.60. ovog Priloga: Izazivanje preosjetljivosti kože *in vitro*: test luciferaze ARE-Nrf2.
9. Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271.–96.
10. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841.–7.
11. Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031.–8.

12. Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390.–8.
13. OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: <https://community.oecd.org/community/iatass>.
14. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275.–284.
15. Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901.–916.

Dodatak 1.

IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE IN VITRO: TEST AKTIVIRANJA LJUDSKE STANIČNE LINIJE (H-CLAT)

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

1. Testom h-CLAT kvantificiraju se promjene u ekspresiji staničnih površinskih biljega povezanih s procesom aktiviranja monocita i dendritičnih stanica (DC) (tj. CD86 i CD54) kod ljudske stanične linije monocitne leukemije THP-1 nakon izlaganja tvarima koje izazivaju preosjetljivost (1. i 2.). Izmjerene razine ekspresije staničnih površinskih biljega CD86 i CD54 zatim se upotrebljavaju kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost kože.
2. Test h-CLAT ocijenjen je u validacijskoj studiji kojom je koordinirao Referentni laboratorij Europske unije za alternative ispitivanju na životinjama (EURL ECVAM) i kasnijem neovisnom stručnom pregledu koji je proveo EURL ECVAM-ov Znanstveni savjetodavni odbor (ESAC). Uzimajući u obzir sve dostupne dokaze i informacije regulatornih tijela i dionika, EURL ECVAM preporučio je da se test h-CLAT (3.) primjenjuje u okviru IATA-e kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost u svrhu razvrstavanja i označavanja prema opasnosti. U literaturi su navedeni primjeri upotrebe podataka dobivenih testom h-CLAT u kombinaciji s ostalim informacijama (4., 5., 6., 7., 8., 9., 10. i 11.).
3. Pokazalo se da se test h-CLAT može prenijeti u laboratorije koji imaju iskustva s tehnikama staničnih kultura i analizom protočnom citometrijom. Može se očekivati da će za predviđanja donesena s pomoću ovog testa razina obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija biti reda veličine 80 % (3. i 12.). Rezultati dobiveni u validacijskoj studiji (13.) i drugim objavljenim studijama (14.) ukupno pokazuju da, u usporedbi s rezultatima analize LLNA, točnost u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože (tj. kategorija 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost iznosi 85 % (N = 142), uz osjetljivost od 93 % (94/101) i specifičnost od 66 % (27/41) (na temelju ponovne analize EURL ECVAM-a (12.), uzimajući u obzir sve postojeće podatke i ne uzimajući u obzir negativne rezultate za kemikalije čiji je Log Kow veći od 3,5, kako je opisano u stavku 4.). Veća je vjerojatnost da će se testom h-CLAT dobiti lažno negativna predviđanja za kemikalije koje pokazuju nisku do umjerenu jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.B prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) nego za kemikalije koje pokazuju visoku jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.A prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) (4., 13. i 15.). Prethodno navedene informacije upućuju na korisnost metode h-CLAT kao elementa koji pridonosi identifikaciji opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože. Međutim, navedene vrijednosti koje se odnose na točnost metode h-CLAT kao samostalnog testa samo su okvirne jer je tu metodu potrebno kombinirati s drugim izvorima informacija u kontekstu IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 7. i 8. iz odjeljka „Opći uvod”. Nadalje, pri ocjenjivanju metoda ispitivanja preosjetljivosti kože koje ne uključuju pokuse na životinjama potrebno je imati na umu da ispitivanje LLNA i druga ispitivanja na životinjama možda neće u potpunosti odražavati situaciju kod ljudi.
4. Trenutačno dostupni podaci pokazuju da se metoda h-CLAT može primijeniti za ispitivanje kemikalija koje obuhvaćaju različite organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (kako je utvrđena istraživanjima *in vivo*) te fizikalno-kemijska svojstva (3., 14. i 15.). Metoda h-CLAT primjenjiva je na ispitivane kemikalije koje su topljive ili tvore stabilnu disperziju (tj. koloid ili suspenziju u kojoj se ispitivana kemikalija ne taloži ili ne odvaja od otapala/nosača stvarajući različite faze) u odgovarajućem otapalu/nosaču (vidjeti stavak 14.) Ispitivane kemikalije čiji je Log Kow veći od 3,5 obično daju lažno negativne rezultate (14.). Stoga negativne rezultate s ispitivanim kemikalijama čiji je Log Kow veći od 3,5 ne treba razmatrati. Međutim, pozitivni rezultati dobiveni s ispitivanim kemikalijama čiji je Log Kow veći od 3,5 ipak se mogu upotrijebiti kao pomoć u identifikaciji ispitivane kemikalije kao tvari koja izaziva preosjetljivost kože. Nadalje, zbog ograničene metaboličke sposobnosti upotrijebljene stanične linije (16.) i uvjeta pokusa prohapteni (tj. tvari koje zahtijevaju enzimsku aktivaciju, na primjer enzima P450) i prehapteni (tj. tvari koje se aktiviraju oksidacijom), posebno oni sa sporom stopom oksidacije, isto tako mogu dati negativne rezultate u testu h-CLAT (15.). Testom h-CLAT mogu se ocijeniti fluorescentne ispitivane kemikalije (17.), ali snažne fluorescentne ispitivane kemikalije koje emitiraju na istoj valnoj duljini kao i fluorescein izotiocijanat (FITC) ili propidijev jodid (PI) ometat će otkrivanje protočnom citometrijom i stoga se ne mogu točno ocijeniti upotrebom protutijela konjugiranih FITC-om ili propidijeva jodida. U tom se slučaju mogu upotrijebiti druga protutijela označena fluorokromom ili drugi biljezi citotoksičnosti pod uvjetom da se može dokazati da daju slične rezultate kao i protutijela označena FITC-om (vidjeti stavak 24.) ili propidijev jodid (vidjeti stavak 18.), npr. ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti u Dodatku 1.2. S obzirom na navedeno, negativne rezultate trebalo bi tumačiti u kontekstu navedenih ograničenja i zajedno s drugim izvorima informacija u okviru IATA-e. U slučajevima u kojima postoje dokazi da se metoda h-CLAT ne može primijeniti za ispitivanje drugih specifičnih kategorija ispitivanih kemikalija, tu metodu ne bi trebalo upotrebljavati za te specifične kategorije.

5. Kao što je opisano, metoda h-CLAT pomaže u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost. Međutim, ako se upotrebljava u okviru integriranih pristupa kao što je IATA, mogla bi pridonijeti i procjeni jačine izazivanja preosjetljivosti (4., 5. i 9.). Ipak, kako bi se moglo utvrditi na koji bi način rezultati dobiveni metodom h-CLAT mogli pomoći u toj procjeni, potreban je dodatan rad koji će se po mogućnosti temeljiti na podacima dobivenima na ljudima.
6. Definicije su navedene u Dodatku 1.1.

NAČELO ISPITIVANJA

7. Metoda h-CLAT je *in vitro* analiza kojom se kvantificiraju promjene u ekspresiji staničnih površinskih biljega (tj. CD86 i CD54) na ljudskoj staničnoj liniji monocitne leukemije, stanicama THP-1, nakon 24-satnog izlaganja ispitivanoj kemikaliji. Te površinske molekule tipični su biljezi aktiviranja monocitnog THP-1 i mogu oponašati aktiviranje dendritičnih stanica, koje ima ključnu ulogu u stimulaciji T-stanica. Promjene u ekspresiji površinskih biljega mjere se protočnom citometrijom nakon bojenja stanica protutijelima označenima fluorokromom. Istodobno se provodi i mjerenje citotoksičnosti kako bi se procijenilo dolazi li do povećanja ekspresije površinskih biljega pri subcitotoksičnim koncentracijama. Računa se relativni intenzitet fluorescencije površinskih biljega u usporedbi s kontrolom s otapalom/nosačem te se on upotrebljava u modelu predviđanja (vidjeti stavak 26.) kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

8. Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost upotrebom deset tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 1.2. Osim toga, korisnici ispitivanja trebaju održavati bazu prijašnjih podataka dobivenih provjerama reaktivnosti (vidjeti stavak 11.) te s pozitivnim kontrolama i kontrolama s otapalom/nosačem (vidjeti stavke od 20. do 22.) i trebaju se koristiti tim podacima kako bi potvrdili da je njihov laboratorij održao obnovljivost ispitivanja tijekom vremena.

POSTUPAK

9. Ovaj se test temelji na protokolu h-CLAT DB-ALM (usluga baze podataka o alternativnim metodama pokusima na životinjama) br. 158 (18.), koji je upotrijebljen u validacijskoj studiji kojom je koordinirao EURL ECVAM. Preporučuje se primjena tog protokola pri provedbi i primjeni metode h-CLAT u laboratoriju. U nastavku su opisane glavne sastavnice i postupci za metodu h-CLAT, koja se sastoji od dva koraka: *testa za utvrđivanje doze i mjerenja ekspresije CD86/CD54*.

Priprema stanica

10. Za provođenje metode h-CLAT treba upotrebljavati THP-1, ljudsku staničnu liniju monocitne leukemije. Preporučuje se da se stanice (TIB-202™) nabave iz kompetentne banke stanica kao što je American Type Culture Collection.
11. Stanice THP-1 uzgajaju se na 37°C s 5 % CO₂ i u vlažnim atmosferskim uvjetima u mediju RPMI-1640 obogaćenom s 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS), 0,05 mM 2-merkaptetanola, 100 jedinica/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina. Može se izbjeći upotreba penicilina i streptomicina u mediju za uzgoj kulture. Međutim, korisnici u tim slučajevima trebaju potvrditi da izostanak antibiotika u mediju za uzgoj kulture ne utječe na rezultate, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 1.2. U svakom slučaju, dobru praksu za održavanje staničnih kultura treba poštovati neovisno o prisustvu ili odsustvu antibiotika u mediju za uzgoj kultura kako bi se smanjio rizik od kontaminacije. Stanice THP-1 rutinski se nasađuju svaka 2–3 dana pri gustoći od 0,1 do 0,2 × 10⁶ stanica/ml. Trebaju se održavati pri gustoći od 0,1 do 1,0 × 10⁶ stanica/ml. Prije njihove upotrebe za ispitivanje treba provjeriti ispunjavaju li stanice zadane kriterije provjerom reaktivnosti. Reaktivnost stanica treba provjeriti upotrebom pozitivnih kontrola, 2,4-dinitroklorbenzena (DNCB) (CAS br. 97-00-7, čistoće ≥ 99 %) i niklova sulfata (NiSO₄) (CAS br. 10101-97-0, čistoće ≥ 99 %) te negativne kontrole, mliječne kiseline (LA) (CAS br. 50-21-5, čistoće ≥ 85 %), dva tjedna nakon odmrzavanja. I DNCB i NiSO₄ trebaju dati pozitivan odgovor za stanične površinske biljege CD86 i CD54, a LA treba dati negativan odgovor za stanične površinske biljege CD86 i CD54. Za test se upotrebljavaju samo stanice koje su prošle provjeru reaktivnosti. Stanice se mogu razmnožavati do dva mjeseca nakon odmrzavanja. Broj pasaža ne bi trebao biti veći od 30. Reaktivnost treba provjeriti u skladu s postupcima opisanim u stavcima od 20. do 24.

12. Za ispitivanje se stanice THP-1 nasađuju pri gustoći od $0,1 \times 10^6$ stanica/ml ili $0,2 \times 10^6$ stanica/ml te se prethodno uzgajaju u tikvicama s kulturom 72 sata ili 48 sati. Važno je da gustoća stanica u tikvici s kulturom neposredno nakon razdoblja pretkulture bude što dosljednija u svim pokusima (upotrebom jednog od dva prethodno opisana uvjeta za pretkulturu) jer bi gustoća stanica u tikvici s kulturom neposredno nakon pretkulture mogla utjecati na ekspresiju CD86/CD54 koju induciraju alergeni (19.). Na dan ispitivanja stanice izdvojene iz tikvice s kulturom ponovno se suspendiraju svježim medijem za uzgoj kultura pri gustoći od 2×10^6 stanica/ml. Stanice se zatim distribuiraju na ploču s 24 jažice s ravnim dnom (500 μ l, 1×10^6 stanica/jažici) ili ploču s 96 jažica s ravnim dnom (80 μ l, $1,6 \times 10^5$ stanica/jažici).

Test za utvrđivanje doze

13. Test za utvrđivanje doze provodi se kako bi se utvrdio CV75, odnosno koncentracija ispitivane kemikalije koja dovodi do vijabilnosti stanica od 75 % (CV) u usporedbi s kontrolom s otapalom/nosačem. Vrijednost CV75 upotrebljava se za utvrđivanje koncentracije ispitivane kemikalije za mjerenje ekspresije CD86/CD54 (vidjeti stavke od 20. do 24.).

Priprema ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

14. Ispitivane kemikalije i kontrolne tvari pripremaju se na dan ispitivanja. Za metodu h-CLAT ispitivane kemikalije otapaju se ili se stabilno dispergiraju (vidjeti i stavak 4.) u fiziološkoj otopini ili mediju kao prvoj opciji za otapalo/nosač ili dimetil sulfoksidu (DMSO, čistoće ≥ 99 %) kao drugoj opciji za otapalo/nosač ako ispitivana kemikalija nije topljiva ili ne tvori stabilnu disperziju u prethodna dva otapala/nosača, tako da se dobije konačna koncentracija od 100 mg/ml (u fiziološkoj otopini ili mediju) ili 500 mg/ml (u DMSO-u). Mogu se upotrebljavati i druga otapala/nosači ako se navede dovoljno dobro znanstveno obrazloženje. Treba uzeti u obzir stabilnost ispitivane kemikalije u konačnom otapalu/nosaču.

15. Počevši od 100 mg/ml (u fiziološkoj otopini ili mediju) ili 500 mg/ml (u DMSO-u) glavnih otopina ispitivanih kemikalija, treba provesti sljedeće korake razrjeđivanja:

- ako se kao otapalo/nosač upotrebljava fiziološka otopina ili medij: priprema se osam glavnih otopina (osam koncentracija) upotrebom odgovarajućeg otapala/nosača u dvostrukim serijskim razrjeđivanjima. Te glavne otopine zatim se dodatno razrjeđuju 50 puta u mediju za uzgoj kulture (radne otopine). Ako najveća konačna koncentracija na ploči od 1 000 μ g/ml nije toksična, najveću koncentraciju treba ponovno utvrditi provođenjem novog ispitivanja citotoksičnosti. Konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od 5 000 μ g/ml za ispitivane kemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u fiziološkoj otopini ili mediju,
- ako se kao otapalo/nosač upotrebljava DMSO: priprema se osam glavnih otopina (osam koncentracija) upotrebom odgovarajućeg otapala/nosača u dvostrukim serijskim razrjeđivanjima. Te glavne otopine zatim se dodatno razrjeđuju 250 puta u mediju za uzgoj kulture (radne otopine). Konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od 1 000 μ g/ml čak i ako ta koncentracija nije toksična.

Radne otopine naposljetku se koriste za izlaganje dodavanjem volumena radne otopine koji je jednak volumenu suspenzije stanica THP-1 na ploči (vidjeti i stavak 17.) kako bi se dobilo dodatno dvostruko razrjeđenje (konačni raspon koncentracija na ploči obično iznosi 7,81–1 000 μ g/ml).

16. Kao kontrola s otapalom/nosačem u metodi h-CLAT upotrebljava se medij za uzgoj kulture (za ispitivane kemikalije otopljene ili stabilno dispergirane (vidjeti stavak 4.) u mediju ili fiziološkoj otopini) ili DMSO (za ispitivane kemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u DMSO-u) ispitani pri jednoj konačnoj koncentraciji na ploči od 0,2 %. Kontrola se podvrgava istom razrjeđivanju kao što je ono opisano za radne otopine u stavku 15.

Primjena ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

17. Medij za uzgoj kulture ili radne otopine opisane u stavcima 15. i 16. miješaju se u omjeru 1: 1 (v/v) sa suspenzijama stanica pripremljenima na ploči s 24 jažice ili s 96 jažica s ravnim dnom (vidjeti stavak 12.). Tretirane se ploče potom inkubiraju $24 \pm 0,5$ h na temperaturi od 37°C s 5 % CO_2 . Treba paziti da ne dođe do isparavanja hlapljivih ispitivanih kemikalija te unakrsne kontaminacije jažica ispitivanim kemikalijama, npr. zatvaranjem ploče prije inkubacije s ispitivanim kemikalijama (20.).

Bojenje propidijevim jodidom (PI)

18. Nakon izlaganja od $24 \pm 0,5$ h stanice se prenose u epruvete za uzorke i prikupljaju centrifugiranjem. Supernatanti se odbacuju, a preostale stanice ponovno se suspendiraju s 200 μl (u slučaju upotrebe 96 jažica) ili 600 μl (u slučaju upotrebe 24 jažice) fiziološke otopine puferirane fosfatnim puferom koja sadržava 0,1 % goveđeg serumskog albumina (pufer za bojenje). 200 μl suspenzije stanica prenosi se na ploču s 96 jažica s okruglim dnom (u slučaju upotrebe 96 jažica) ili mikroeprevetu (u slučaju upotrebe 24 jažice) te se dvaput ispiru s 200 μl (u slučaju upotrebe 96 jažica) ili 600 μl (u slučaju upotrebe 24 jažice) pufera za bojenje. Stanice se naposljetku ponovno suspendiraju u puferu za bojenje (npr. 400 μl) i dodaje se otopina propidijeva jodida (npr. 20 μl) (na primjer, konačna koncentracija propidijeva jodida iznosi 0,625 $\mu\text{g/ml}$). Mogu se koristiti i drugi biljezi citotoksičnosti, kao što su 7-aminoaktinomycin D (7-AAD), tripansko modriilo ili drugi, ako se može pokazati da alternativna bojila daju slične rezultate kao i propidijev jodid, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 1.2.

Mjerenje citotoksičnosti protočnom citometrijom i procjena vrijednosti CV75

19. Apsorbancija propidijeva jodida analizira se upotrebom protočne citometrije s kanalom očitavanja FL-3. Očitava se ukupno 10 000 živih stanica (negativnih na PI). Vijabilnost stanica može se izračunati tako da se u programu za analizu citometra upotrijebi sljedeća jednadžba. Ako je vijabilnost stanica niska, treba se očitati do 30 000 stanica, uključujući mrtve stanice. Umjesto toga, podaci se mogu očitavati jednu minutu nakon početka analize.

$$\text{vijabilnost stanica} = \frac{\text{broj živih stanica}}{\text{ukupan broj očitanih stanica}} \times 100$$

Vrijednost CV75 (vidjeti stavak 13.), tj. koncentracija koja pokazuje preživljavanje stanica THP-1 od 75 % (citotoksičnost od 25 %), računa se log-linearnom interpolacijom, upotrebom sljedeće jednadžbe:

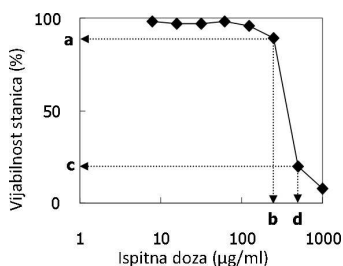
$$\text{Log CV75} = \frac{(75 - c) \times \text{Log}(b) - (75 - a) \times \text{Log}(d)}{a - c}$$

pri čemu je:

a najmanja vrijednost vijabilnosti stanica koja je veća od 75 %;

c najveća vrijednost vijabilnosti stanica koja je manja od 75 %;

b i d su koncentracije koje pokazuju vrijednost vijabilnosti stanica a odnosno c.



Mogu se upotrebljavati i drugi pristupi za izvođenje vrijednosti CV75 pod uvjetom da se dokaže da to ne utječe na rezultate (npr. ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti).

Mjerenje ekspresije CD86/CD54

Priprema ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

20. Za otapanje ili stabilno dispergiranje ispitivanih kemikalija upotrebljava se odgovarajuće otapalo/nosač (fiziološka otopina, medij ili DMSO; vidjeti stavak 14.). Ispitivane kemikalije prvo se razrjeđuju na koncentraciju koja odgovara vrijednosti koja je 100 puta (za fiziološku otopinu ili medij) ili 500 puta (za DMSO) veća od $1,2 \times CV75$ utvrđenom u testu za utvrđivanje doze (vidjeti stavak 19.). Ako se CV75 ne može utvrditi (tj. u testu za utvrđivanje doze nije uočena dovoljna citotoksičnost), kao početnu koncentraciju treba upotrijebiti najvišu koncentraciju ispitivane kemikalije pripremljenu sa svakim otapalom/nosačem koja se može otopiti ili stabilno dispergirati. Napominje se da konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od $5\,000\ \mu\text{g/ml}$ (u slučaju fiziološke otopine ili medija) ili $1\,000\ \mu\text{g/ml}$ (u slučaju DMSO-a). Zatim se prave serijska razrjeđivanja s faktorom razrjeđivanja od 1,2 upotrebom odgovarajućeg otapala/nosača kako bi se dobile glavne otopine (osam koncentracija u rasponu od $100 \times 1,2 \times CV75$ do $100 \times 0,335 \times CV75$ (za fiziološku otopinu ili medij) ili od $500 \times 1,2 \times CV75$ do $500 \times 0,335 \times CV75$ (za DMSO)) koje se ispituju metodom h-CLAT (primjer plana doziranja vidjeti u protokolu DB-ALM br. 158). Glavne otopine zatim se dodatno razrjeđuju 50 puta (za fiziološku otopinu ili medij) ili 250 puta (za DMSO) u mediju za uzgoj kulture (radne otopine). Te radne otopine naposljetku se upotrebljavaju za izlaganje uz dodatni faktor dvostrukog konačnog razrjeđivanja na ploči. Ako rezultati ne ispunjavaju kriterije prihvatljivosti opisane u stavcima 29. i 30. u pogledu vijabilnosti stanica, test za utvrđivanje doze može se ponoviti kako bi se utvrdila preciznija vrijednost CV75. Napominje se da se za mjerenje ekspresije CD86/CD54 mogu upotrebljavati samo ploče s 24 jažice.
21. Kontrola s otapalom/nosačem priprema se kako je opisano u stavku 16. U metodi h-CLAT kao pozitivna kontrola upotrebljava se DNCB (vidjeti stavak 11.), za koji se glavne otopine pripremaju u DMSO-u i razrjeđuju kako je opisano za glavne otopine u stavku 20. DNCB treba upotrebljavati kao pozitivnu kontrolu za mjerenje ekspresije CD86/CD54 pri jednoj konačnoj koncentraciji na ploči (obično $4,0\ \mu\text{g/ml}$). Kako bi se na ploči dobila koncentracija DNCB-a od $4,0\ \mu\text{g/ml}$, priprema se glavna otopina DNCB-a u DMSO-u od $2\ \text{mg/ml}$, koja se dodatno razrjeđuje 250 puta medijem za uzgoj kulture kako bi se dobila radna otopina od $8\ \mu\text{g/ml}$. Umjesto toga, kao koncentracija pozitivne kontrole može se upotrebljavati i CV75 DNCB-a, koji se utvrđuje u svakoj ustanovi koja provodi ispitivanje. Mogu se upotrijebiti druge prikladne pozitivne kontrole, pod uvjetom da su dostupni prijašnji podaci na temelju kojih se mogu odrediti usporedivi kriteriji prihvatljivosti ciklusa. Kod pozitivnih kontrola jedna konačna koncentracija na ploči ne bi trebala biti veća od $5\,000\ \mu\text{g/ml}$ (u slučaju fiziološke otopine ili medija) ili $1\,000\ \mu\text{g/ml}$ (u slučaju DMSO-a). Kriteriji prihvatljivosti ciklusa isti su kao i oni opisani za ispitivanu kemikaliju (vidjeti stavak 29.), osim u slučaju posljednjeg kriterija prihvatljivosti jer se pozitivna kontrola ispituje u samo jednoj koncentraciji.

Primjena ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

22. Za svaku ispitivanu kemikaliju i kontrolnu tvar potreban je jedan pokus kako bi se dobilo predviđanje. Svaki se pokus sastoji od najmanje dva neovisna ciklusa za mjerenje ekspresije CD86/CD54 (vidjeti stavke od 26. do 28.). Svaki se neovisni ciklus provodi na različite dane ili na isti dan ako su za svaki ciklus ispunjeni sljedeći uvjeti: a) pripremljene su svježe glavne i radne otopine ispitivane kemikalije i otopine s protutijelima i b) upotrebljavaju se neovisno izdvojene stanice (tj. stanice su prikupljene iz različitih tikvica s kulturom); međutim, stanice mogu biti iz iste pasaže. Ispitivane kemikalije i kontrolne tvari pripremljene kao radne otopine ($500\ \mu\text{l}$) miješaju se s $500\ \mu\text{l}$ suspendiranih stanica (1×10^6 stanica) u omjeru 1: 1 te se stanice inkubiraju $24 \pm 0,5\ \text{h}$ kako je opisano u stavcima 20. i 21. U svakom je ciklusu dovoljno jedno ponavljanje za svaku koncentraciju ispitivane kemikalije i kontrolne tvari jer se predviđanje izvodi na temelju najmanje dva neovisna ciklusa.

Bojenje i analiza stanica

23. Nakon $24 \pm 0,5\ \text{h}$ izlaganja stanice se prenose s ploče s 24 jažice u epruvete za uzorke, prikupljaju se centrifugiranjem i zatim dvaput ispiru s $1\ \text{ml}$ pufera za bojenje (ako je potrebno, mogu se provesti dodatni koraci ispiranja). Nakon ispiranja stanice se blokiraju sa $600\ \mu\text{l}$ otopine za blokiranje (pufer za bojenje koji sadržava $0,01\ \%$ (w/v) globulina (Cohnova frakcija II, III, humana; SIGMA, #G2388-10G ili ekvivalentno)) i inkubiraju 15 minuta na 4°C . Nakon blokiranja stanice se podijele u tri alikvota od $180\ \mu\text{l}$ na ploču s 96 jažica s okruglim dnom ili u mikroepruvetu.
24. Nakon centrifugiranja stanice se boje s $50\ \mu\text{l}$ protutijela anti-CD86, anti-CD54 ili mišjih protutijela IgG1 (izotip) označenih FITC-om na 4°C u trajanju od 30 minuta. Trebaju se upotrebljavati protutijela opisana u protokolu h-CLAT DB-ALM br. 158 (18.) razrjeđivanjem u omjeru 3: 25 v/v (za CD86 (BD-PharMingen, #555657; klon: Fun-1)) ili 3: 50 v/v (za CD54 (DAKO, #F7143; klon: 6.5B5) i IgG1 (DAKO, #X0927)) puferom za bojenje. Subjekti koji su razvili ispitivanje utvrdili su da ti faktori razrjeđenja protutijela daju najbolji omjer signala i šuma. Na temelju iskustva subjekata koji su razvili ispitivanje intenzitet fluorescencije protutijela obično je dosljedan među različitim serijama.

Međutim, korisnici mogu razmotriti titraciju protutijela u uvjetima svojeg laboratorija kako bi utvrdili koje je koncentracije najbolje upotrebljavati. Mogu se koristiti i druga protutijela anti-CD86 i/ili anti-CD54 označena fluorokromom ako se može pokazati da ona daju slične rezultate kao i protutijela konjugirana FITC-om, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 1.2. Treba napomenuti da promjena klona ili dobavljača protutijela, kako je opisano u protokolu h-CLAT DB-ALM br. 158 (18.), može utjecati na rezultate. Nakon ispiranja sa 150 µl pufera za bojenje dva ili više puta stanice se ponovno suspendiraju u puferu za bojenje (npr. 400 µl) i dodaje se otopina propidijeva jodida (npr. 20 µl kako bi se dobila konačna koncentracija od 0,625 µg/ml) ili otopina drugog biljega citotoksičnosti (vidjeti stavak 18.). Razine ekspresije CD86 i CD54 te vijabilnost stanica analiziraju se upotrebom protočne citometrije.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Procjena podataka

25. Ekspresija CD86 i CD54 analiza se protočnom citometrijom s kanalom očitavanja FL-1. Na temelju geometrijske sredine intenziteta fluorescencije (MFI) relativni intenzitet fluorescencije (RFI) za CD86 i CD54 za stanice pozitivne kontrole (ctrl) i stanice tretirane kemikalijama računa se u skladu sa sljedećom jednadžbom:

$$RFI = \frac{MFI \text{ stanica tretiranih kemikalijom} - MFI \text{ stanica kontrole izotipa tretiranih kemikalijom}}{MFI \text{ stanica kontrole tretiranih otapalom/nosačem} - MFI \text{ stanica kontrole izotipa tretiranih otapalom/nosačem}} \times 100$$

Vijabilnost stanica iz stanica kontrole izotipa (ctrl) (koje se boje mišjim protutijelima IgG1 (izotip)) isto se računa prema jednadžbi opisanoj u stavku 19.

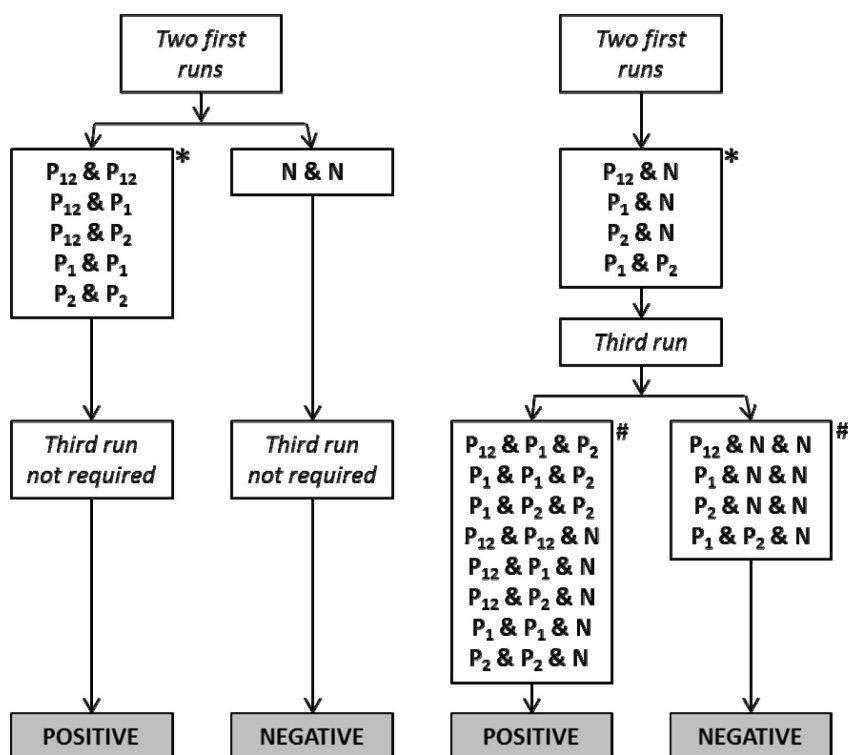
Model predviđanja

26. Kod mjerenja ekspresije CD86/CD54 svaka ispitivana kemikalija ispituje se u najmanje dva neovisna ciklusa kako bi se izvelo jedno predviđanje (POZITIVNO ili NEGATIVNO). Predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra se POZITIVNIM ako je ispunjen barem jedan od sljedećih uvjeta u dva od dva neovisna ciklusa ili u barem dva od tri neovisna ciklusa; u protivnom se predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra NEGATIVNIM (slika 1.):

— RFI za CD86 jednak je ili veći od 150 % pri svim ispitanim koncentracijama (uz vijabilnost stanica ≥ 50 %),

— RFI za CD54 jednak je ili veći od 200 % pri svim ispitanim koncentracijama (uz vijabilnost stanica ≥ 50 %).

27. Na temelju prethodno navedenoga, ako su prva dva ciklusa pozitivna za CD86 i/ili su oba pozitivna za CD54, predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra se POZITIVNIM i ne mora se provoditi treći ciklus. Slično tomu, ako su prva dva ciklusa negativna za oba biljega, predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra se NEGATIVNIM (uzimajući u obzir odredbe stavka 30.) i nije potreban treći ciklus. Međutim, ako prva dva ciklusa nisu usklađena za barem jedan od biljega (CD54 ili CD86), potreban je treći ciklus i konačno predviđanje temeljit će se na većinskom rezultatu triju neovisnih ciklusa (tj. na dva ciklusa od tri provedena). Kad je riječ o tome, treba napomenuti da je potreban treći ciklus ako se provode dva neovisna ciklusa i jedan je pozitivan samo za CD86 (dalje u tekstu „P₁”), a drugi je pozitivan samo za CD54 (dalje u tekstu „P₂”). Ako je treći ciklus negativan za oba biljega (dalje u tekstu „N”), predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra se NEGATIVNIM. S druge strane, ako je treći ciklus pozitivan za bilo koji biljeg (P₁ ili P₂) ili za oba biljega (dalje u tekstu „P₁₂”), predviđanje na temelju testa h-CLAT smatra se POZITIVNIM.



Slika 1.: Model predviđanja koji se upotrebljava u metodi h-CLAT. Predviđanje na temelju testa h-CLAT trebalo bi razmatrati u okviru IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 7. i 8. iz odjeljka „Opći uvod”.

P₁: ciklus u kojem je samo CD86 pozitivan; P₂: ciklus u kojem je samo CD54 pozitivan; P₁₂: ciklus u kojem su i CD86 i CD54 pozitivni; N: ciklus u kojem ni CD86 ni CD54 nisu pozitivni.

* U okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz prva dva ciklusa, neovisno o redoslijedu kojim se mogu dobiti.

U okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz tri ciklusa na temelju rezultata dobivenih u prva dva ciklusa prikazana u prethodnom okviru, ali ne odražavaju redoslijed kojim se mogu dobiti.

28. Za ispitivane kemikalije koje se testom h-CLAT predvide kao POZITIVNE mogu se utvrditi dvije vrijednosti učinkovite koncentracije (EC), EC150 za CD86 i EC200 za CD54, tj. koncentracije pri kojima su ispitivane kemikalije inducirale RFI od 150 ili 200. Te bi vrijednosti EC potencijalno mogle pridonijeti procjeni jačine izazivanja preosjetljivosti (9.) ako se upotrebljavaju u okviru integriranih pristupa kao što je IATA (4., 5., 6., 7. i 8.). Mogu se izračunati prema sljedećim jednadžbama:

$$EC\ 150\ (za\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (za\ CD54) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

pri čemu je:

A_{conc} = najniža koncentracija u µg/ml kod koje je RFI > 150 (CD86) ili 200 (CD54)

B_{conc} = najviša koncentracija u µg/ml kod koje je RFI < 150 (CD86) ili 200 (CD54)

A_{RFI} = RFI pri najnižoj koncentraciji kod koje je RFI > 150 (CD86) ili 200 (CD54)

B_{RFI} = RFI pri najvišoj koncentraciji kod koje je RFI < 150 (CD86) ili 200 (CD54)

Radi preciznijeg izvođenja vrijednosti EC150 i EC200 možda će biti potrebna tri neovisna ciklusa za mjerenje ekspresije CD86/CD54. Konačne vrijednosti EC150 i EC200 zatim se određuju kao srednja vrijednost EC-ova izračunanih iz tri neovisna ciklusa. Ako samo dva od tri neovisna ciklusa ispunjavaju kriterije za pozitivan rezultat (vidjeti stavke 26. i 27.), prihvaća se viša vrijednost od dviju izračunanih vrijednosti EC150 ili EC200.

Kriteriji prihvatljivosti

29. Sljedeći bi kriteriji prihvatljivosti trebali biti ispunjeni kada se primjenjuje metoda h-CLAT (22. i 27.).

- Vijabilnost stanica u kontroli s medijem i kontrolama s otapalom/nosačem trebala bi biti veća od 90 %.
- Kod kontrole s otapalom/nosačem, vrijednosti RFI i za CD86 i za CD54 ne bi trebale biti veće od pozitivnog kriterija (RFI za CD86 ≥ 150 % i RFI za CD54 ≥ 200 %). Vrijednosti RFI kontrole s otapalom/nosačem računaju se upotrebom formula opisanih u stavku 25. („MFI kemikalije” treba zamijeniti „MFI-jem otapala/nosača”, a „MFI otapala/nosača” treba zamijeniti „MFI-jem kontrole (s medijem)”).
- I za kontrole s medijem i kontrole s otapalom/nosačem omjer MFI-ja i za CD86 i za CD54 u odnosu na kontrolu izotipa treba biti > 105 %.
- Kod pozitivne kontrole (DNCB), vrijednosti RFI i za CD86 i za CD54 trebaju ispuniti pozitivne kriterije (RFI za CD86 ≥ 150 i RFI za CD54 ≥ 200), a vijabilnost stanica treba biti veća od 50 %.
- Kod ispitivane kemikalije vijabilnost stanica treba biti veća od 50 % u najmanje četiri ispitane koncentracije u svakom ciklusu.

30. Negativni rezultati prihvatljivi su samo za ispitivane kemikalije koje pokazuju vijabilnost stanica manju od 90 % pri najvišoj ispitanoj koncentraciji (tj. $1,2 \times CV75$ u skladu s planom razrjeđivanja opisanim u stavku 20.). Ako vijabilnost stanica pri koncentraciji od $1,2 \times CV75$ iznosi 90 % ili više, negativan rezultat treba odbaciti. U tom se slučaju preporučuje da se pokuša preciznije odrediti odabir doze ponovnim utvrđivanjem vrijednosti CV75. Treba napomenuti da je negativan rezultat prihvatljiv čak i ako je vijabilnost stanica veća od 90 % ako se kao najveća ispitivana koncentracija ispitivane kemikalije upotrebljava 5 000 $\mu\text{g/ml}$ u fiziološkoj otopini (ili mediju ili drugim otapalima/nosačima), 1 000 $\mu\text{g/ml}$ u DMSO-u ili najviša topljiva koncentracija.

Izvješće o ispitivanju

31. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija

Tvar s jednim sastojkom:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- fizički izgled, Log Kow, topljivost u vodi, topljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa:

- opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti prethodno), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- fizički izgled, topljivost u vodi, topljivost u DMSO-u te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- molekularna masa ili prividna molekularna masa u slučaju smjesa/polimera poznatog sastava ili druge informacije koje su relevantne za provođenje studije,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- fizički izgled, Log K_{ow} , topljivost u vodi, topljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni i ako je primjenjivo,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- upućivanje na rezultate koji se odnose na prijašnje pozitivne kontrole i pokazuju primjerenost kriterija prihvatljivosti ciklusa, ako je primjenjivo.

Negativna kontrola i kontrola s otapalom/nosačem:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- fizički izgled, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva u slučaju da su upotrijebljene kontrole s otapalom/nosačem koje nisu navedene u smjernici za ispitivanje, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Ispitni uvjeti:

- naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja,
- opis upotrijebljenog ispitivanja,
- upotrijebljena stanična linija, uvjeti njezina skladištenja i izvor (npr. objekt iz kojeg su dobiveni),
- upotrijebljena protočna citometrija (npr. model), uključujući upotrijebljene postavke instrumenta, globulin, protutijela i biljege citotoksičnosti,
- postupak koji je primijenjen za dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitivanja ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti te postupak koji je primijenjen za dokazivanje obnovljive primjene ispitivanja tijekom vremena, npr. podaci o prijašnjim kontrolama i/ili prijašnjim provjerama reaktivnosti.

Kriteriji prihvatljivosti ispitivanja:

- vijabilnost stanica, vrijednosti MFI i RFI dobivene kontrolom s otapalom/nosačem u usporedbi s rasponima prihvatljivosti,
- vijabilnost stanica i vrijednosti RFI dobivene pozitivnom kontrolom u usporedbi s rasponima prihvatljivosti,
- vijabilnost stanica svih ispitanih koncentracija ispitane kemikalije.

Ispitni postupak:

- broj upotrijebljenih ciklusa,
- koncentracije ispitivane kemikalije, primjena i vrijeme izloženosti (ako je drukčije od preporučenog),
- opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i odlučivanja,
- opis mogućih izmjena ispitnog postupka.

Rezultati:

- tablični prikaz podataka, uključujući CV75 (ako je primjenjivo), geometrijski MFI, RFI, vrijednosti vijabilnosti stanica, vrijednosti EC150/EC200 (ako je primjenjivo) dobivene za ispitivanu kemikaliju i za pozitivnu kontrolu u svakom ciklusu te klasifikacija ispitivane kemikalije prema modelu predviđanja,
- opis svih drugih relevantnih opažanja, ako je primjenjivo.

Rasprava o rezultatima:

- rasprava o rezultatima dobivenima metodom h-CLAT,
- rasprava o rezultatima ispitivanja u kontekstu IATA-e ako su dostupni drugi relevantni podaci.

Zaključci

LITERATURA

1. Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767.–773.
2. Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428.–437.
3. EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitization testing. Dostupno na: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>.
4. Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318.–1332.
5. Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333.–1347.
6. Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489.–504.
7. Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371.–379.
8. Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337.–351.
9. Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355.–2383.

10. Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol*. DOI 10.1002/jat.3281.
11. Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150.–60.
12. EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Dostupno na: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>.
13. EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Dostupno na: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>.
14. Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599.–609.
15. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275.–284.
16. Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683.–1699.
17. Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. *AATEX* 15, 81.–88.
18. DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Dostupno na: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>.
19. Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. *AATEX* 13, 70.–82.

20. Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89.–96.
21. OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz, Francuska, 2005., str. 96.
22. OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Dostupno na: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
23. Ujedinjeni narodi (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
24. ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
25. Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27.–35.

Dodatak 1.1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti testa i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda testa (21.).

AOP (engl. *Adverse Outcome Pathway* – put nastanka štetnog ishoda): slijed događaja od kemijske strukture ciljne kemikalije ili skupine sličnih kemikalija preko početnog molekularnog događaja do štetnog ishoda *in vivo* (22.).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

CV75: procijenjena koncentracija koja pokazuje vijabilnost stanica od 75 %.

EC150: koncentracije koje pokazuju vrijednosti RFI od 150 u ekspresiji CD86.

EC200: koncentracije koje pokazuju vrijednosti RFI od 200 u ekspresiji CD54.

Protočna citometrija: citometrijska tehnika u kojoj stanice suspendirane u tekućini jedna po jedna protječu kroz fokus ekscitacijske svjetlosti koja se raspršuje u uzorcima koji se specifični za stanice i njihove komponente; stanice su često označene fluorescentnim biljezima tako da se svjetlost prvo apsorbira, a zatim emitira pri izmijenjenim frekvencijama.

Opasnost: intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koje ima potencijal uzrokovanja štetnih učinaka kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

IATA (engl. *Integrated Approach to Testing and Assessment* – integrirani pristup ispitivanju i procjeni): strukturiran pristup koji se primjenjuje za identifikaciju opasnosti (potencijal), karakterizaciju opasnosti (jakost) i/ili procjenu sigurnosti (potencijal/jakost i izloženost) kemikalije ili skupine kemikalija, kojim se na strateški način objedinjuju i ponderiraju svi relevantni podaci koji će služiti kao podloga za donošenje regulatornih odluka u vezi s potencijalnom opasnošću i/ili rizikom i/ili potrebom za daljnjim ciljnim, a time i minimalnim ispitivanjem.

Kontrola s medijem: netretirani ponovljeni uzorak koji sadržava sve sastavnice ispitnog sustava. Taj se uzorak obrađuje s uzorcima tretiranima ispitivanom kemikalijom i drugim kontrolnim uzorcima kako bi se utvrdilo je li otapalo/nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % (w/w) ili većoj te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

Pozitivna kontrola: ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da izaziva pozitivan odgovor. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Prehapteni: kemikalije koje abiotičkom pretvorbom postaju tvari koje izazivaju preosjetljivost.

Prohapteni: kemikalije kojima je potrebna enzimaska aktivacija da bi mogle pokazati potencijal izazivanja preosjetljivosti kože.

Relativni intenzitet fluorescencije (RFI): relativne vrijednosti geometrijske sredine intenziteta fluorescencije (MFI) kod stanica tretiranih kemikalijom u usporedbi s MFI-jem stanica tretiranih otapalom/nosačem.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživnog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje i razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitivanja (21.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanje može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (21.).

Ciklus: ciklus se sastoji od jedne ispitivane kemikalije ili više njih koje se ispituju istodobno s kontrolom s otapalom/nosačem i pozitivnom kontrolom.

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (21.).

Pufer za bojenje: fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom koja sadržava 0,1 % goveđeg serumskog albumina.

Kontrola s otapalom/nosačem: netretirani uzorak koji ne sadržava ispitivanu kemikaliju, ali sadržava sve ostale komponente ispitnog sustava te otapalo/nosač koji se upotrebljava u ispitivanju. Upotrebljava se za utvrđivanje polaznog odgovora za uzorke koji se tretiraju ispitivanom kemikalijom otopljenom ili stabilno dispergiranom u istom otapalu/nosaču. Kada se ispituje s istodobnom kontrolom s medijem, taj uzorak isto tako pokazuje je li otapalo/nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (21.).

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnome stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom metodom.

Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti i opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (23.).

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Valjano ispitivanje: ispitivanje za koje se smatra da je dovoljno relevantno i pouzdano za određenu svrhu te koje se temelji na znanstveno utemeljenim načelima. ispitivanje nikada nije valjano u apsolutnom smislu nego samo u odnosu na određenu svrhu (21.).

Dodatak 1.2.

TVARI ZA DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost tako što će za deset tvari preporučenih u tablici 1. dobiti očekivano predviđanje na temelju testa h-CLAT te za najmanje osam od deset tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti dobiti vrijednosti CV75, EC150 i EC200 koje su unutar odgovarajućeg referentnog raspona. Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti izabrane su tako da predstavljaju niz odgovora povezanih s opasnostima od izazivanja preosjetljivosti kože. Ostali kriteriji za odabir uključivali su komercijalnu dostupnost tvari te dostupnost visokokvalitetnih *in vivo* referentnih podataka i visokokvalitetnih *in vitro* podataka dobivenih metodom h-CLAT. Isto tako, za metodu h-CLAT dostupni su objavljeni referentni podaci (3. i 14.).

Tablica 1.

Preporučene tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za provedbu metode h-CLAT

Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti	CAS br.	Agregatno stanje	Predviđanje <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	Referentni raspon za CV75 u µg/ml ⁽²⁾	Rezultati testa h-CLAT za CD86 (referentni raspon za EC150 u µg/ml) ⁽²⁾	Rezultati testa h-CLAT za CD54 (referentni raspon za EC200 u µg/ml) ⁽²⁾
2,4-dinitroklorbenzen	97-00-7	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (ekstremno jaka)	2–12	Pozitivno (0,5–10)	Pozitivno (0,5–15)
4-fenilendiamin	106-50-3	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (jaka)	5–95	Pozitivno (< 40)	Negativno (> 1,5) ⁽³⁾
Niklov sulfat	10101-97-0	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	30–500	Pozitivno (< 100)	Pozitivno (10–100)
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	30–400	Negativno (> 10) ⁽³⁾	Pozitivno (10–140)
R(+)-limonen	5989-27-5	Tekućina	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	> 20	Negativno (> 5) ⁽³⁾	Pozitivno (< 250)
Imidazolidinil urea	39236-46-9	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	25–100	Pozitivno (20–90)	Pozitivno (20–75)
Izopropanol	67-63-0	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	> 5 000	Negativno (> 5 000)	Negativno (> 5 000)
Glicerol	56-81-5	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	> 5 000	Negativno (> 5 000)	Negativno (> 5 000)
Mliječna kiselina	50-21-5	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	1 500–5 000	Negativno (> 5 000)	Negativno (> 5 000)
4-aminobenzojeva kiselina	150-13-0	Kruta tvar	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	> 1 000	Negativno (> 1 000)	Negativno (> 1 000)

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima.

⁽¹⁾ Predviđanje opasnosti (i jakosti) *in vivo* temelji se na podacima dobivenima s pomoću analize LLNA (3. i 14.). Jakost *in vivo* utvrđena je prema kriterijima koje je predložio ECETOC (24.).

⁽²⁾ Na temelju vrijednosti uočenih u prijašnjim ispitivanjima (13. i 25.).

⁽³⁾ U prijašnjim je ispitivanjima za taj biljeg dobivena većina negativnih rezultata i stoga se uglavnom očekuje negativan rezultat. Navedeni raspon utvrđen je na temelju nekoliko uočenih prijašnjih pozitivnih rezultata. Ako se dobije pozitivan rezultat, vrijednost EC treba biti unutar navedenog referentnog raspona.

Dodatak 2.

IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE IN VITRO: TEST AKTIVIRANJA STANIČNE LINIJE U937 (U-SENS™)

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

1. Testom U-SENS™ kvantificiraju se promjene u ekspresiji staničnih površinskih biljega povezanih s procesom aktiviranja monocita i dendritičnih stanica (DC) (tj. CD86) kod ljudske stanične linije histiocitnog limfoma U937, nakon izlaganja tvarima koje izazivaju preosjetljivost (1.). Izmjerene razine ekspresije staničnih površinskih biljega CD86 kod stanične linije U937 zatim se upotrebljavaju kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost.
2. Test U-SENS™ ocijenjen je u validacijskoj studiji (2.) kojom je koordinirao L'Oreal te ga je kasnije neovisno stručno pregledao Znanstveni savjetodavni odbor (ESAC) Referentnog laboratorija Europske unije za alternative ispitivanju na životinjama (EURL ECVAM) (3.). Uzimajući u obzir sve dostupne dokaze i informacije regulatornih tijela i dionika, EURL ECVAM je preporučio da se test U-SENS™ (4.) primjenjuje u okviru IATA-e kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost u svrhu razvrstavanja i označivanja prema opasnosti. U smjernicama za izvješćivanje o strukturiranim pristupima integraciji podataka i pojedinačnim izvorima informacija koji se upotrebljavaju u okviru IATA-e za preosjetljivost kože OECD trenutačno raspravlja o nizu studija slučaja u kojima se opisuju različite strategije ispitivanja i modeli predviđanja. Jedan od različitih utvrđenih pristupa temelji se na testu U-SENS (5.). Primjeri upotrebe podataka dobivenih testom U-SENS™ u kombinaciji s ostalim informacijama, uključujući prijašnje podatke i postojeće valjane podatke dobivene na ljudima (6.) navode se i u drugoj literaturi (4., 5. i 7.).
3. Pokazalo se da se test U-SENS™ može prenijeti u laboratorije koji imaju iskustva s tehnikama staničnih kultura i analizom protočnom citometrijom. Može se očekivati da će za predviđanja donesena s pomoću ovog testa razina obnovljivosti unutar jednog laboratorija biti reda veličine 90 %, a između više laboratorija 84 % (8.). Rezultati dobiveni u validacijskoj studiji (8.) i drugim objavljenim studijama (1.) ukupno pokazuju da, u usporedbi s rezultatima analize LLNA, točnost u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože (tj. kategorija 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost iznosi 86 % (N = 166), uz osjetljivost od 91 % (118/129) i specifičnost od 65 % (24/37). U usporedbi s podacima dobivenima na ljudima, točnost u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost (tj. kategorija 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost iznosi 77 % (N = 101) uz osjetljivost od 100 % (58/58) i specifičnost od 47 % (20/43). U usporedbi s analizom LLNA, veća je vjerojatnost da će se metodom U-SENS™ dobiti lažno negativna predviđanja kod kemikalija koje pokazuju nisku do umjerenu jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.B prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) nego kod kemikalija koje pokazuju veliki potencijal izazivanja preosjetljivosti kože (tj. potkategorija 1.A prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) (1., 8. i 9.). Prethodno navedene informacije upućuju na korisnost testa U-SENS™ kao elementa koji pridonosi identifikaciji opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože. Međutim, navedene vrijednosti koje se odnose na točnost metode U-SENS™ kao samostalnog testa samo su okvirne jer je taj test potrebno kombinirati s drugim izvorima informacija u kontekstu IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 7. i 8. iz odjeljka „Opći uvod”. Nadalje, pri ocjenjivanju metoda ispitivanja preosjetljivosti kože koje ne uključuju pokuse na životinjama potrebno je imati na umu da ispitivanje LLNA i druga ispitivanja na životinjama možda neće u potpunosti odražavati situaciju kod ljudi.
4. Na temelju podataka koji su trenutačno dostupni pokazalo se da je test U-SENS™ primjenjiv na ispitivane kemikalije (uključujući kozmetičke sastojke, npr. konzervanse, površinski aktivne tvari, aktivne tvari, boje) koje obuhvaćaju različite organske funkcionalne skupine, fizikalno-kemijska svojstva, jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (kako je utvrđena u istraživanjima *in vivo*) i spektar mehanizama reakcije za koje je poznato da su povezani s preosjetljivošću kože (tj. Michaelov akceptor, nastanak Schiffovih baza, agens za prijenos acila, bimolekulska nukleofilna supstitucija [SN2] ili nukleofilna aromatska supstitucija [SNAr]) (1., 8., 9. i 10.). Test U-SENS™ primjenjiv je na ispitivane kemikalije koje su topljive ili tvore stabilnu disperziju (tj. koloid ili suspenziju u kojoj se ispitivana kemikalija ne taloži ili ne odvaja od otapala/nosača stvarajući različite faze) u odgovarajućem otapalu/nosaču (vidjeti stavak 13.). Za kemikalije u skupu podataka za koje je navedeno da su prehapteni (tj. tvari koje se aktiviraju oksidacijom) ili prohapteni (tj. tvari koje zahtijevaju enzimsku aktivaciju, na primjer enzimima P450) testom U-SENS™ dobivena su točna predviđanja (1. i 10.). Tvari koje djeluju disruptivno na membranu mogu dovesti do lažno pozitivnih rezultata zbog nespecifičnog povećanja ekspresije CD86, s obzirom na to da su tri lažno pozitivna rezultata od

njih sedam, u odnosu na referentno razvrstavanje *in vivo*, dale površinski aktivne tvari (1.). Stoga bi pozitivne rezultate dobivene s površinski aktivnim tvarima trebalo uzeti u obzir s oprezom, dok bi se negativni rezultati i dalje mogli upotrebljavati kao pomoć u identifikaciji ispitivane kemikalije kao tvari koja ne izaziva preosjetljivost. Testom U-SENS™ mogu se ocijeniti fluorescentne ispitivane kemikalije (1.), ali snažne fluorescentne ispitivane kemikalije koje emitiraju na istoj valnoj duljini kao i fluorescein izotiocijanat (FITC) ili propidijev jodid (PI) ometat će otkrivanje protočnom citometrijom i stoga se ne mogu točno ocijeniti upotrebom protutijela konjugiranih FITC-om (potencijalni lažno negativni rezultati) ili propidijevim jodidom (ne može se izmjeriti vijabilnost). U tom se slučaju mogu upotrijebiti druga protutijela označena fluorokromom ili drugi biljezi citotoksičnosti pod uvjetom da se može dokazati da daju slične rezultate kao i protutijela označena FITC-om ili propidijev jodid (vidjeti stavak 18.), npr. ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. S obzirom na navedeno, pozitivne rezultate s površinski aktivnim tvarima i negativne rezultate s jako fluorescentnim ispitivanim kemikalijama trebalo bi tumačiti u kontekstu navedenih ograničenja i zajedno s drugim izvorima informacija u okviru IATA-e. U slučajevima u kojima postoje dokazi da se test U-SENS™ ne može primijeniti za ispitivanje drugih specifičnih kategorija ispitivanih kemikalija, taj test ne bi trebalo upotrebljavati za te specifične kategorije.

5. Kao što je opisano, test U-SENS™ pomaže u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost. Međutim, ako se upotrebljava u okviru integriranih pristupa kao što je IATA, mogao bi pridonijeti i procjeni jačine izazivanja preosjetljivosti. Ipak, kako bi se moglo utvrditi na koji bi način rezultati dobiveni testom U-SENS™ mogli pomoći u toj procjeni, potreban je dodatan rad, koji će se po mogućnosti temeljiti na podacima dobivenima na ljudima.
6. Definicije su navedene u Dodatku 2.1.

NAČELO ISPITIVANJA

7. Test U-SENS™ je analiza *in vitro* kojom se kvantificiraju promjene u ekspresiji staničnih površinskih biljega CD86 na ljudskoj staničnoj liniji histiocitnog limfoma, stanicama U937, nakon izlaganja ispitivanoj kemikaliji 45 ± 3 h. Površinski biljeg CD86 jedan je tipični biljeg aktivacije stanica U937. Poznato je da je CD86 kostimulacijska molekula koja može oponašati aktiviranje monocita, koje ima ključnu ulogu u stimulaciji T-stanica. Promjene u ekspresiji staničnih površinskih biljega CD86 mjere se protočnom citometrijom nakon bojenja stanica, obično protutijelima označenima fluorescein izotiocijanatom (FITC). Istodobno se provodi i mjerenje citotoksičnosti (npr. upotrebom propidijeva jodida) kako bi se procijenilo dolazi li do povećanja ekspresije staničnih površinskih biljega CD86 pri subcitotoksičnim koncentracijama. Računa se indeks stimulacije (S.I.) staničnih površinskih biljega CD86 u usporedbi s kontrolom s otapalom/nosačem te se on upotrebljava u modelu predviđanja (vidjeti stavak 19.) kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost.

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

8. Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost upotrebom deset tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 2.2. u skladu s dobrom praksom za metode *in vitro* (11.). Osim toga, korisnici ispitivanja trebaju održavati bazu prijašnjih podataka dobivenih provjerama reaktivnosti (vidjeti stavak 11.) te s pozitivnim kontrolama i kontrolama s otapalom/nosačem (vidjeti stavke 15. i 16.) i trebaju se koristiti tim podacima kako bi potvrdili da je njihov laboratorij održao obnovljivost ispitivanja tijekom vremena.

POSTUPAK

9. Ovaj se test temelji na protokolu U-SENS™ DB-ALM (usluga baze podataka o alternativnim metodama pokusima na životinjama) br. 183 (12.). Pri provedbi i primjeni testa U-SENS™ u laboratoriju treba primjenjivati standardne operativne postupke (SOP). Za provedbu testa U-SENS™ može se koristiti i automatizirani sustav ako se može pokazati da on daje slične rezultate, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. U nastavku su opisane glavne komponente i postupci za test U-SENS™.

Priprema stanica

10. Za provedbu testa U-SENS™ treba upotrebljavati U937, ljudsku staničnu liniju histiocitnog limfoma (13.). Stanice (klon CRL1593.2) treba nabaviti iz kompetentne banke stanica kao što je American Type Culture Collection.
11. Stanice U937 uzgajaju se na 37 °C s 5 % CO₂ i u vlažnim atmosferskim uvjetima u mediju RPMI-1640 obogaćenom s 10 % fetalnog telećeg seruma (FCS), 2 mM L-glutamina, 100 jedinica/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina (potpuni medij). Stanice U937 rutinski se pasažiraju svaka 2–3 dana pri gustoći od 1,5 ili 3×10^5 stanica/ml. Gustoća stanica ne bi trebala biti veća od 2×10^6 stanica/ml, a vijabilnost stanica izmjerena izbacivanjem tripanskog modrila treba biti ≥ 90 % (ne primjenjuje se kod prve pasaže nakon odmrzavanja). Prije njihove upotrebe za ispitivanje treba provjeriti ispunjava li svaka šarža stanica, FCS-a ili protutijela zadane kriterije provjerom reaktivnosti. Provjeru reaktivnosti stanica treba provesti upotrebom pozitivne kontrole, 2,4,6-trinitrobenzensulfonske kiseline (TNBS) (CAS br. 2508-19-2, čistoće ≥ 99 %) i negativne kontrole, mliječne kiseline (LA) (CAS br. 50-21-5, čistoće ≥ 85 %), barem jedan tjedan nakon odmrzavanja. U provjeri reaktivnosti treba ispitati šest konačnih koncentracija za svaku od dviju kontrola (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml te LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). TNBS otopljen u potpunom mediju treba dati pozitivan odgovor za CD86 koji je povezan s koncentracijom (npr. kada pozitivnu koncentraciju, indeks stimulacije za CD86 ≥ 150 , prati koncentracija s rastućim indeksom stimulacije za CD86), a mliječna kiselina otopljena u potpunom mediju treba dati negativan odgovor za CD86 (vidjeti stavak 21.). Za test treba upotrebljavati samo šaržu stanica koja je dvaput prošla provjeru reaktivnosti. Stanice se mogu razmnožavati do sedam tjedana nakon odmrzavanja. Broj pasaža ne bi trebao biti veći od 21. Reaktivnost treba provjeriti u skladu s postupcima opisanim u stavcima od 18. do 22.
12. Za ispitivanje se stanice U937 nasađuju pri gustoći od 3×10^5 stanica/ml ili 6×10^5 stanica/ml te se prethodno uzgajaju u tikvicama s kulturom dva dana ili jedan dan. Mogu se upotrebljavati drugačiji uvjeti za prethodni uzgoj od prethodno opisanih ako se navede dovoljno dobro znanstveno obrazloženje i ako se može pokazati da oni daju slične rezultate, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. Na dan ispitivanja stanice izdvojene iz tikvice s kulturom ponovno se suspendiraju svježim medijem za uzgoj kultura pri gustoći od 5×10^5 stanica/ml. Stanice se zatim distribuiraju na ploču s 96 jažica s ravnim dnom sa 100 µl (konačna gustoća stanica od $0,5 \times 10^5$ stanica/jažici).

Priprema ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

13. Prije ispitivanja procjenjuje se topljivost. U tu se svrhu ispitivane kemikalije otapaju ili stabilno dispergiraju pri koncentraciji od 50 mg/ml u potpunom mediju kao prvoj opciji za otapalo ili dimetil sulfoksidu (DMSO, čistoće ≥ 99 %) kao drugoj opciji za otapalo/nosač ako ispitivana kemikalija nije topljiva u potpunom mediju kao otapalu/nosaču. Za ispitivanje se ispitivana kemikalija otapa do konačne koncentracije od 0,4 mg/ml u potpunom mediju ako je kemikalija topljiva u tom otapalu/nosaču. Ako je kemikalija topljiva samo u DMSO-u, kemikalija se otapa do koncentracije od 50 mg/ml. Mogu se upotrebljavati i druga otapala/nosači ako se navede dovoljno dobro znanstveno obrazloženje. Treba uzeti u obzir stabilnost ispitivane kemikalije u konačnom otapalu/nosaču.
14. Ispitivane kemikalije i kontrolne tvari pripremaju se na dan ispitivanja. Budući da se ne provodi test za utvrđivanje doze, u prvom ciklusu treba ispitati šest konačnih koncentracija (1, 10, 20, 50, 100 i 200 µg/ml) u odgovarajućem otapalu/nosaču, odnosno potpunom mediju ili 0,4-postotnom DMSO-u u mediju. U naknadnim se ciklusima pripremaju barem četiri radne otopine ispitivane kemikalije (tj. barem četiri koncentracije) upotrebom odgovarajućeg otapala/nosača, počevši od 0,4 mg/ml u potpunom mediju ili 50 mg/ml u DMSO-u. Radne otopine naposljetku se koriste za tretiranje dodavanjem volumena suspenzije stanica U937 (vidjeti prethodni stavak 11.) koji je jednak volumenu radne otopine na ploči kako bi se dobilo dodatno dvostruko razrjeđenje (12.). Koncentracije (najmanje četiri koncentracije) za daljnje cikluse odabiru se na temelju pojedinačnih rezultata svih prethodnih ciklusa (8.). Mogu se upotrebljavati konačne koncentracije od 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 i 200 µg/ml. Najveća konačna koncentracija iznosi 200 µg/ml. Ako se pri koncentraciji od 1 µg/ml uoči pozitivna vrijednost za CD86, ocjenjuje se 0,1 µg/ml kako bi se pronašla koncentracija ispitivane kemikalije koja ne inducira CD86 veći od pozitivnog praga. Za svaki se ciklus računa EC150 (koncentracija pri kojoj kemikalija dosegne pozitivan prag za CD86 od 150 %, vidjeti stavak 19.) ako se uoči pozitivan odgovor na koncentraciju za

CD86. Ako ispitivana kemikalija inducira pozitivan odgovor za CD86 koji nije povezan s koncentracijom, izračun vrijednosti EC150 možda neće biti relevantan, kako je opisano u protokolu U-SENS™ DB-ALM br. 183 (12.). Za svaki se ciklus računa CV70 (koncentracija pri kojoj kemikalija dosegne prag citotoksičnosti od 70 %, vidjeti stavak 19.) kad god je to moguće (12.). Kako bi se istražio učinak odgovora na koncentraciju kod povećanja CD86, treba odabrati bilo koje koncentracije od upotrebljivih koncentracija koje su ravnomjerno raspoređene od EC150 (ili najveće koncentracije kod koje je CD86 negativan i koja nije citotoksična) do CV70 (ili najveće dopuštene koncentracije, tj. 200 µg/ml). Treba ispitati najmanje četiri koncentracije po ciklusu pri čemu barem dvije koncentracije trebaju biti iste kao i u prethodnom ciklusu radi usporedbe.

15. Kao kontrola s otapalom/nosačem u testu U-SENS™ upotrebljava se potpuni medij (za ispitivane kemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u potpunom mediju) (vidjeti stavak 4.) ili 0,4-postotni DMSO u potpunom mediju (za ispitivane kemikalije otopljene ili stabilno dispergirane u DMSO-u).
16. Kao pozitivna kontrola u testu U-SENS™ upotrebljava se TNBS (vidjeti stavak 11.) pripremljen u potpunom mediju. TNBS treba upotrebljavati kao pozitivnu kontrolu za mjerenje ekspresije CD86 pri jednoj konačnoj koncentraciji na ploči (50 µg/ml) koja daje vijabilnost stanica > 70 %. Kako bi se na ploči dobila koncentracija TNBS-a od 50 µg/ml, priprema se glavna otopina TNBS-a od 1 M (tj. 293 mg/ml) u potpunom mediju, koja se dodatno razrjeđuje 2 930 puta potpunim medijem kako bi se dobila radna otopina od 100 µg/ml. Kao negativnu kontrolu treba upotrebljavati mliječnu kiselinu (LA, CAS 50-21-5) koncentracije 200 µg/ml, otopljenu u potpunom mediju (iz glavne otopine od 0,4 mg/ml). Na svakoj ploči svakog ciklusa pripremaju se tri ponavljanja netretirane kontrole s potpunim medijem, kontrole s otapalom/nosačem, negativne i pozitivne kontrole (12.). Mogu se upotrijebiti druge prikladne pozitivne kontrole, pod uvjetom da su dostupni prijašnji podaci na temelju kojih se mogu odrediti usporedivi kriteriji prihvatljivosti ciklusa. Kriteriji prihvatljivosti ciklusa isti su kao i oni opisani za ispitivanu kemikaliju (vidjeti stavak 12.).

Primjena ispitivanih kemikalija i kontrolnih tvari

17. Kontrola s otapalom/nosačem ili radne otopine opisane u stavcima od 14. do 16. miješaju se u omjeru 1: 1 (v/v) sa suspenzijama stanica pripremljenima na ploči s 96 jažica s ravnim dnom (vidjeti stavak 12.). Tretirane se ploče potom inkubiraju 45 ± 3 h na temperaturi od 37°C s 5 % CO_2 . Ploče se prije inkubacije zatvaraju polupropusnom membranom kako bi se spriječilo isparavanje hlapljivih ispitivanih kemikalija i unakrsna kontaminacija stanica tretiranih ispitivanim kemikalijama (12.).

Bojenje stanica

18. Nakon izlaganja od 45 ± 3 h stanice se prenose u mikrotitracijsku ploču u obliku slova „v” i prikupljaju centrifugiranjem. Interferencija s topljivošću definira se kao uočavanje kristala ili kapljica upotrebom mikroskopa 45 ± 3 h nakon tretiranja (prije bojenja stanica). Supernatanti se odbacuju, a preostale stanice ispiru se jednom sa 100 µl vrlo hladne fiziološke otopine puferirane fosfatnim puferom (PBS) koja sadržava 5 % fetalnog telećeg seruma (pufer za bojenje). Nakon centrifugiranja stanice se ponovno suspendiraju sa 100 µl pufera za bojenje i boje se 5 µl (npr. 0,25 µg) protutijela anti-CD86 ili mišjih protutijela IgG1 (izotip) označenih FITC-om na 4°C u trajanju od 30 minuta, zaštićeno od svjetla. Treba upotrebljavati protutijela opisana u protokolu U-SENS™ DB-ALM br. 183 (12.) (za CD86: BD-PharMingen #5556 57 klon: Fun-1, ili Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klon: BU63; a za IgG1: BD-PharMingen #5557 48 ili Caltag/Invitrogen # GM4992). Na temelju iskustva subjekata koji su razvili ispitivanje intenzitet fluorescencije protutijela obično je dosljedan među različitim serijama. Za test se mogu upotrebljavati i drugi klonovi ili dobavljači protutijela koji su prošli provjeru reaktivnosti (vidjeti stavak 11.). Međutim, korisnici mogu razmotriti titraciju protutijela u uvjetima svojeg laboratorija kako bi utvrdili koju je koncentraciju najbolje upotrebljavati. Mogu se koristiti i drugi detekcijski sustavi, npr. protutijela anti-CD86 označena fluorokromom, ako se

može pokazati da daju slične rezultate kao i protutijela konjugirana FITC-om, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2. Nakon ispiranja sa 100 µl pufera za bojenje dva puta i jednom sa 100 µl vrlo hladnog PBS-a, stanice se ponovno suspendiraju u vrlo hladnom PBS-u (npr. 125 µl za uzorke koji se analiziraju ručno u pojedinačnim epruvetama ili 50 µl ako se upotrebljava ploča za automatsko uzorkovanje) i dodaje se otopina propidijeva jodida (konačna koncentracija od 3 µg/ml). Mogu se koristiti i drugi biljezi citotoksičnosti, kao što su 7-aminoaktinomycin D (7-AAD) ili tripansko modriilo, ako se može pokazati da alternativna bojila daju slične rezultate kao i propidijev jodid, na primjer, ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti iz Dodatka 2.2.

Analiza protočnom citometrijom

19. Razina ekspresije CD86 i vijabilnost stanica analiziraju se upotrebom protočne citometrije. Stanice se prikazuju u točkastom dijagramu s veličinom (FSC) i granularnošću (SSC) na logaritamskoj skali kako bi se jasno identificirala populacija u prvim vratima R1 i uklonili ostaci. Za svaku se jažicu nastoji očitati ukupno 10 000 stanica u vratima R1. Stanice iz istih vrata R1 prikazuju se u FL3 ili FL4/SSC točkastom dijagramu. Žive stanice ograničavaju se postavljanjem drugih vrata R2 kojima se odabire populacija stanica negativnih na propidijev jodid (kanal FL3 ili FL4). Vijabilnost stanica može se izračunati tako da se u programu za analizu citometra upotrijebi sljedeća jednadžba. Ako je vijabilnost stanica niska, može se očitati do 20 000 stanica, uključujući mrtve stanice. Umjesto toga, podaci se mogu očitavati jednu minutu nakon početka analize.

$$\text{vijabilnost stanica} = \frac{\text{broj živih stanica}}{\text{ukupan broj očitanih stanica}} \times 100$$

Zatim se među tim živim stanicama ograničenima na vratima R2 (unutar R1) mjeri postotak pozitivnih stanica u kanalu FL1. Stanična površinska ekspresija za CD86 analizira se u FL1/SSC točkastom dijagramu ograničenom na žive stanice (R2).

Za jažice koje sadržavaju potpuni medij/IgG1 marker za analizu postavlja se blizu glavne populacije tako da je IgG1 kontrola s potpunim medijem unutar ciljanog područja od 0,6 do 0,9 %.

Interferencija s bojom definira se kao pomak u točkastom dijagramu za IgG1 označen FITC-om (IgG1 FL1 Geo srednja vrijednost S.I. ≥ 150 %).

Indeks stimulacije (S.I.) za CD86 za kontrolne stanice (netretirane ili u 0,4-postotnom DMSO-u) i stanice tretirane kemikalijama računa se u skladu sa sljedećom jednadžbom:

$$\text{S.I.} = \frac{\% \text{CD86}^+ \text{tretiranih stanica} - \% \text{IgG1}^+ \text{tretiranih stanica}}{\% \text{CD86}^+ \text{kontrolnih stanica} - \% \text{IgG1}^+ \text{kontrolnih stanica}} \times 100$$

% IgG1⁺ netretiranih kontrolnih stanica: odnosi se na postotak pozitivnih stanica IgG1 u kanalu FL1 koje se definiraju markerom za analizu (prihvaćeni raspon od $\geq 0,6$ % do $< 1,5$ %, vidjeti stavak 22.) među živim netretiranim stanicama.

% IgG1⁺/CD86⁺ kontrolnih/tretiranih stanica: odnosi se na postotak pozitivnih stanica IgG1/CD86 u kanalu FL1 koji se mjeri bez pomicanja markera za analizu među živim kontrolnim/tretiranim stanicama.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Procjena podataka

20. U testu U-SENSTM računaju se sljedeći parametri: vrijednost CV70, tj. koncentracija koja pokazuje preživljavanje stanica U937 od 70 % (citotoksičnost od 30 %), i vrijednost EC150, tj. koncentracija pri kojoj su ispitivane kemikalije inducirale indeks stimulacije (S.I.) za CD86 od 150 %.

CV70 se računa log-linearnom interpolacijom, upotrebom sljedeće jednadžbe:

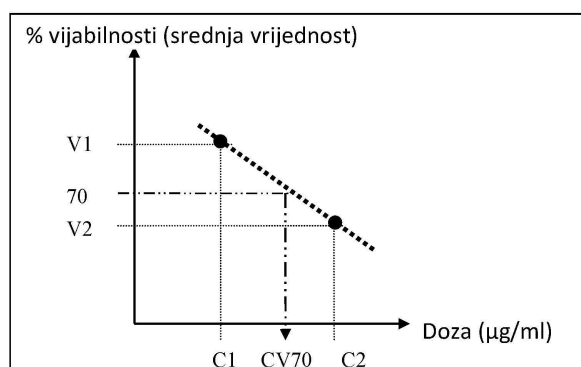
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

pri čemu je:

V1 najmanja vrijednost vijabilnosti stanica koja je veća od 70 %;

V2 najveća vrijednost vijabilnosti stanica koja je manja od 70 %;

C1 i C2 su koncentracije koje pokazuju vrijednost vijabilnosti stanica V1 odnosno V2.



Mogu se upotrebljavati i drugi pristupi za izvođenje vrijednosti CV70 pod uvjetom da se dokaže da to ne utječe na rezultate (npr. ispitivanjem tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti).

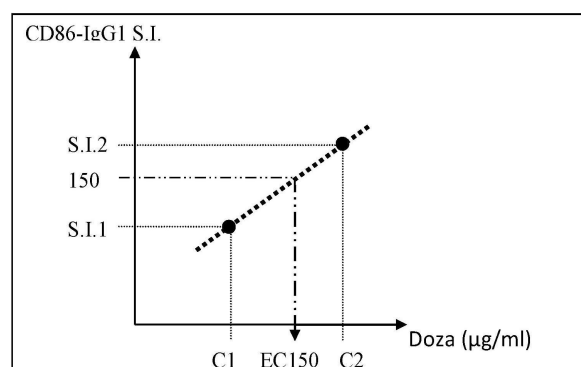
EC150 se računa log-linearnom interpolacijom, upotrebom sljedeće jednadžbe:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

pri čemu je:

C1 = najviša koncentracija u µg/ml kod koje je S.I. za CD86 < 150 % (S.I. 1)

C2 = najniža koncentracija u µg/ml kod koje je S.I. za CD86 ≥ 150 % (S.I. 2).



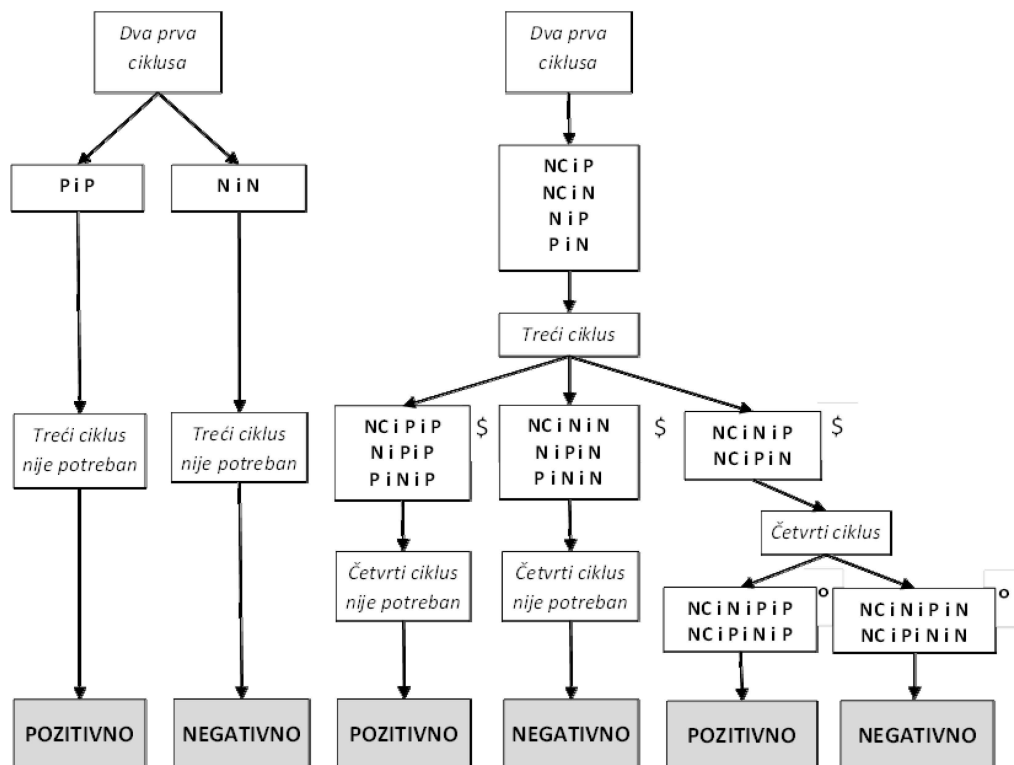
Vrijednosti EC150 i CV70 računaju se:

- za svaki ciklus: pojedinačne vrijednosti EC150 i CV70 upotrebljavaju se kao alati za ispitivanje učinka odgovora na koncentraciju kod povećanja CD86 (vidjeti stavak 14.),
- na temelju prosječnih vijabilnosti utvrđuje se ukupni CV70 (12.),
- na temelju prosječnog indeksa stimulacije vrijednosti CD86 utvrđuje se ukupni EC150 za ispitivanu kemikaliju za koju se testom U-SENS™ predviđa da je POZITIVNA (vidjeti stavak 21.) (12.).

Model predviđanja

21. Kod mjerenja ekspresije CD86 svaka ispitivana kemikalija ispituje se primjenom najmanje četiri koncentracije i u najmanje dva neovisna ciklusa (koji se provode na različite dane) kako bi se izvelo jedno predviđanje (NEGATIVNO ili POZITIVNO).

- Pojedinačni zaključak ciklusa U-SENS™ smatra se negativnim (dalje u tekstu „N”) ako je indeks stimulacije za CD86 manji od 150 % pri svim koncentracijama koje nisu citotoksične (vijabilnost stanica $\geq 70\%$) i ako se ne uoči nikakva interferencija (citotoksičnost, topljivost: vidjeti stavak 18. ili boja: vidjeti stavak 19., neovisno o necitotoksičnim koncentracijama pri kojima se opazi interferencija). U svim ostalim slučajevima: pojedinačni zaključak ciklusa U-SENS™ smatra se pozitivnim (dalje u tekstu „P”) ako je indeks stimulacije za CD86 jednak ili veći od 150 % i/ili ako se uoče interferencije.
- Predviđanje na temelju testa U-SENS™ smatra se NEGATIVNIM ako su negativna (N) barem dva neovisna ciklusa (slika 1.). Ako su prva dva ciklusa negativna (N), predviđanje na temelju testa U-SENS™ smatra se NEGATIVNIM i ne mora se provoditi treći ciklus.
- Predviđanje na temelju testa U-SENS™ smatra se POZITIVNIM ako su pozitivna (P) barem dva neovisna ciklusa (slika 1.). Ako su prva dva ciklusa pozitivna (P), predviđanje na temelju testa U-SENS™ smatra se POZITIVNIM i ne mora se provoditi treći ciklus.
- Budući da se ne provodi test za utvrđivanje doze primjenjuje se iznimka ako je u prvom ciklusu indeks stimulacije za CD86 jednak ili veći od 150 % samo pri najvišoj necitotoksičnoj koncentraciji. Smatra se da ciklus tada NIJE JEDNOZNAČAN (NC) i u dodatnim ciklusima treba ispitati dodatne koncentracije (između najviše koncentracije koja ne uzrokuje citotoksičnost i najniže koncentracije koja uzrokuje citotoksičnost – vidjeti stavak 20.). Ako se ciklus identificira kao NC, treba provesti barem dva dodatna ciklusa, a i četvrti ciklus ako drugi i treći nisu usklađeni (neovisno N i/ili P) (slika 1.). Naknadni ciklusi smatraju se pozitivnima čak i ako samo jedna necitotoksična koncentracija pokaže CD86 jednak ili veći od 150 % jer je postavka koncentracije prilagođena za specifičnu ispitivanu kemikaliju. Konačno predviđanje temeljit će se na većinskom rezultatu iz tri ili četiri pojedinačna ciklusa (tj. dva od tri ili dva od četiri) (slika 1.).



Slika 1.: Model predviđanja koji se upotrebljava u testu U-SENS™. Predviđanje na temelju testa U-SENS™ trebalo bi razmatrati u okviru IATA-e i u skladu s odredbama stavka 4. te stavaka 7., 8. i 9. iz odjeljka „Opći uvod”.

N: ciklus u kojem nije uočen pozitivan CD86 ili interferencija.

P: ciklus u kojem je uočen pozitivan CD86 i/ili interferencija.

NC: nije jednoznačno. Nije jednoznačno u prvom ciklusu ako je CD86 pozitivan samo pri najvišoj koncentraciji koja nije citotoksična.

#: pojedinačni zaključak koji nije jednoznačan (NC) koji se pripiše samo prvom ciklusu automatski podrazumijeva da je potreban treći ciklus kako bi se dobio većinski pozitivan (P) ili negativan (N) zaključak u barem dva od tri neovisna ciklusa.

\$: u okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz tri ciklusa na temelju rezultata dobivenih u prva dva ciklusa prikazana u prethodnom okviru.

°: u okvirima su prikazane relevantne kombinacije rezultata iz četiri ciklusa na temelju rezultata dobivenih u prva tri ciklusa prikazana u prethodnom okviru.

Kriteriji prihvatljivosti

22. Sljedeći bi kriteriji prihvatljivosti trebali biti ispunjeni kada se primjenjuje test U-SENS™ (12.).

- Na kraju razdoblja izlaganja od 45 ± 3 h srednja vijabilnost kod tri ponavljanja netretiranih stanica U937 morala je biti $> 90 \%$ i bez uočenog pomaka u ekspresiji CD86. Bazalna ekspresija CD86 kod netretiranih stanica U937 morala je biti u rasponu od $\geq 2 \%$ do $\leq 25 \%$.
- Ako se kao otapalo upotrebljava DMSO, valjanost kontrole s nosačem DMSO procjenjuje se računanjem indeksa stimulacije za DMSO u usporedbi s netretiranim stanicama i srednja vijabilnost u tri ponavljanja stanica morala je biti $> 90 \%$. Kontrola s nosačem DMSO valjana je ako je srednja vrijednost S.I. za CD86 u tri ponavljanja bila manja od 250% srednje vrijednosti S.I. u tri ponavljanja za CD86 netretiranih stanica U937.
- Ciklusi se smatraju valjanima ako su barem dvije od tri vrijednosti IgG1 netretiranih stanica U937 bile u rasponu od $\geq 0,6 \%$ do $< 1,5 \%$.
- Istodobno ispitana negativna kontrola (mliječna kiselina) smatra se valjanom ako su barem dva od tri ponavljanja bila negativna (S.I. za CD86 $< 150 \%$) i necitotoksična (vijabilnost stanica $\geq 70 \%$).
- Pozitivna kontrola (TNBS) smatrala se valjanom ako su barem dva od tri ponavljanja bila pozitivna (S.I. za CD86 $\geq 150 \%$) i necitotoksična (vijabilnost stanica $\geq 70 \%$).

Izvješće o ispitivanju

23. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija

Tvar s jednim sastojkom:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,

- fizički izgled, topljivost u potpunom mediju, topljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa:

- opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti prethodno), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- fizički izgled, topljivost u potpunom mediju, topljivost u DMSO-u te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- molekularna masa ili prividna molekularna masa u slučaju smjesa/polimera poznatog sastava ili druge informacije koje su relevantne za provođenje studije,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- fizički izgled, topljivost u DMSO-u, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni i ako je primjenjivo,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

- upućivanje na rezultate koji se odnose na prijašnje pozitivne kontrole i pokazuju primjerenost kriterija prihvatljivosti ciklusa, ako je primjenjivo.

Negativna kontrola i kontrola s otapalom/nosačem:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- fizički izgled, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva u slučaju da su upotrijebljene kontrole s otapalom/nosačem koje nisu navedene u smjernici za ispitivanje, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju.

Ispitni uvjeti:

- naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja,
- opis upotrijebljenog ispitivanja,
- upotrijebljena stanična linija, uvjeti njezina skladištenja i izvor (npr. objekt iz kojeg su dobiveni),
- upotrijebljena protočna citometrija (npr. model), uključujući upotrijebljene postavke instrumenta, protutijela i biljege citotoksičnosti,
- postupak koji je primijenjen za dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitivanja ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti te postupak koji je primijenjen za dokazivanje obnovljive primjene ispitivanja tijekom vremena, npr. podaci o prijašnjim kontrolama i/ili prijašnjim provjerama reaktivnosti.

Kriteriji prihvatljivosti ispitivanja:

- vijabilnost stanica i vrijednosti indeksa stimulacije za CD86 dobivene kontrolom s otapalom/nosačem u usporedbi s rasponima prihvatljivosti,
- vijabilnost stanica i vrijednosti indeksa stimulacije dobivene pozitivnom kontrolom u usporedbi s rasponima prihvatljivosti,
- vijabilnost stanica svih ispitanih koncentracija ispitane kemikalije.

Ispitni postupak:

- broj upotrijebljenih ciklusa,
- koncentracije ispitivane kemikalije, primjena i vrijeme izloženosti (ako je drukčije od preporučenog),
- trajanje izlaganja,

- opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i odlučivanja,
- opis mogućih izmjena ispitnog postupka.

Rezultati:

- tablični prikaz podataka, uključujući CV70 (ako je primjenjivo), indeks stimulacije, vrijednosti vijabilnosti stanica, vrijednosti EC150 (ako je primjenjivo) dobivene za ispitivanu kemikaliju i za pozitivnu kontrolu u svakom ciklusu te klasifikacija ispitivane kemikalije prema modelu predviđanja,
- opis svih drugih relevantnih opažanja, ako je primjenjivo.

Rasprava o rezultatima:

- rasprava o rezultatima dobivenima testom U-SENS™,
- rasprava o rezultatima ispitivanja u kontekstu IATA-e ako su dostupni drugi relevantni podaci.

Zaključci

LITERATURA

1. Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901.–916.
2. EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Dostupno na: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations.
3. EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2787/815737. Dostupno na: [<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705>].
4. EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2760/588955. Dostupno na: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
5. Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
6. OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].

7. Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337.–351.
8. Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373.–382.
9. Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehn, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259.–270.
10. Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683.–1696.
11. OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
12. DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Dostupno na: [<http://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu/>].
13. Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565.–577.
14. OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
15. Ujedinjeni narodi (UN) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Dostupno na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
16. OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
17. ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Bruxelles. Dostupno na: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Dodatak 2.1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitivanja i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitivanja (14.).

AOP (engl. *Adverse Outcome Pathway put nastanka štetnog ishoda*): slijed događaja od kemijske strukture ciljne kemikalije ili skupine sličnih kemikalija preko početnog molekularnog događaja do *in vivo* štetnog ishoda (15.).

Odgovor na koncentraciju CD86: ovisnost o koncentraciji (ili odgovor na koncentraciju) postoji ako pozitivnu koncentraciju (S.I. za CD86 ≥ 150) prati koncentracija s rastućim indeksom stimulacije za CD86.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

CV70: procijenjena koncentracija koja pokazuje vijabilnost stanica od 70 %.

Pomak: pomak se definira na sljedeći način i. ispravljena vrijednost % CD86⁺ netretiranog kontrolnog ponavljanja 3 manja je od 50 % srednje ispravljene vrijednosti % CD86⁺ netretiranih kontrolnih ponavljanja 1 i 2 i ii. ispravljena vrijednost % CD86⁺ negativnog kontrolnog ponavljanja 3 manja je od 50 % srednje ispravljene vrijednosti % CD86⁺ negativnih kontrolnih ponavljanja 1 i 2.

EC150: procijenjene koncentracije koje pokazuju 150 % indeksa stimulacije ekspresije CD86.

Protočna citometrija: citometrijska tehnika u kojoj stanice suspendirane u tekućini jedna po jedna protječu kroz fokus ekscitacijske svjetlosti koja se raspršuje u uzorcima koji se specifični za stanice i njihove komponente; stanice su često označene fluorescentnim biljezima tako da se svjetlost prvo apsorbira, a zatim emitira pri izmijenjenim frekvencijama.

Opasnost: intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koje ima potencijal uzrokovanja štetnih učinaka kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

IATA (engl. *Integrated Approach to Testing and Assessment integrirani pristup ispitivanju i procjeni*): strukturiran pristup koji se primjenjuje za identifikaciju opasnosti (potencijal), karakterizaciju opasnosti (jakost) i/ili procjenu sigurnosti (potencijal/jakost i izloženost) kemikalije ili skupine kemikalija, kojim se na strateški način objedinjuju i ponderiraju svi relevantni podaci koji će služiti kao podloga za donošenje regulatornih odluka u vezi s potencijalnom opasnošću i/ili rizikom i/ili potrebom za daljnjim ciljnim, a time i minimalnim ispitivanjem.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % (w/w) ili većoj te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

Pozitivna kontrola: ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da izaziva pozitivan odgovor. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Prehapteni: kemikalije koje abiotičkom pretvorbom postaju tvari koje izazivaju preosjetljivost, npr. oksidacijom.

Prohapteni: kemikalije kojima je potrebna enzimska aktivacija da bi mogle pokazati potencijal izazivanja preosjetljivosti kože.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživanog učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje i razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitivanja (14.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanje može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (14.).

Ciklus: ciklus se sastoji od jedne ispitivane kemikalije ili više njih koje se ispituju istodobno s kontrolom s otapalom/nosačem i pozitivnom kontrolom.

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (14.).

S.I.: indeks stimulacije. Relativne vrijednosti geometrijske sredine intenziteta fluorescencije kod stanica tretiranih kemikalijom u usporedbi sa stanicama tretiranim otapalom.

Kontrola s otapalom/nosačem: netretirani uzorak koji ne sadržava ispitivanu kemikaliju, ali sadržava sve ostale komponente ispitnog sustava te otapalo/nosač koji se upotrebljava u ispitivanju. Upotrebljava se za utvrđivanje polaznog odgovora za uzorke koji se tretiraju ispitivanom kemikalijom otopljenom ili stabilno dispergiranom u istom otapalu/nosaču. Kada se ispituje s istodobnom kontrolom s medijem, taj uzorak isto tako pokazuje je li otapalo/nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (14.).

Pufer za bojenje: fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom koja sadržava 5 % fetalnog telećeg seruma.

Tvar: kemijski element i njegovi spojevi u prirodnome stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, što uključuje i aditive koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenoga postupka, ali isključuje otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovim ispitivanjem.

Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti i opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (16.).

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenljivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Valjano ispitivanje: ispitivanje za koje se smatra da je dovoljno relevantno i pouzdano za određenu svrhu te koje se temelji na znanstveno utemeljenim načelima. ispitivanje nikada nije valjano u apsolutnom smislu nego samo u odnosu na određenu svrhu (14.).

Dodatak 2.2.

TVARI ZA DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost tako što će za deset tvari preporučenih u tablici 1. dobiti očekivano predviđanje na temelju testa U-SENS™ te za najmanje osam od deset tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti dobiti vrijednosti CV70 i EC150 koje su unutar odgovarajućeg referentnog raspona. Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti izabrane su tako da predstavljaju niz odgovora povezanih s opasnostima od izazivanja preosjetljivosti kože. Ostali kriteriji za odabir uključivali su to da je tvar komercijalno dostupna te da su dostupni visokokvalitetni *in vivo* referentni podaci i visokokvalitetni *in vitro* podaci dobiveni testom U-SENS™. Isto tako, za test U-SENS™ dostupni su objavljeni referentni podaci (1. i 8.).

Tablica 1. 1

Preporučene tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za izvođenje testa U-SENS™

Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti	CAS br.	Agregatno stanje	Predviđanje <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	U-SENS Otapa-lo/nosač	U-SENS Referentni raspon za CV70 u µg/ml ⁽²⁾	U-SENS Referentni raspon za EC150 u µg/ml ⁽²⁾
4-fenilendiamin	106-50-3	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (jaka)	Potpuni medij ⁽³⁾	< 30	Pozitivno (≤ 10)
2,4,6-trinitrobenzen-sulfonska kiselina	2508-19-2	Tekućina	Tvar koja izaziva preosjetljivost (jaka)	Potpuni medij	> 50	Pozitivno (≤ 50)
Dietil-maleat	141-05-9	Tekućina	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	DMSO	10–100	Pozitivno (≤ 20)
Rezorcinol	108-46-3	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	Potpuni medij	> 100	Pozitivno (≤ 50)
Cinaminski alkohol	104-54-1	Kruta tvar	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	DMSO	> 100	Pozitivno (10–100)
4-alilanol	140-67-0	Tekućina	Tvar koja izaziva preosjetljivost (slaba)	DMSO	> 100	Pozitivno (< 200)
Saharin	81-07-2	Kruta tvar	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	DMSO	> 200	Negativno (> 200)
Glicerol	56-81-5	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Potpuni medij	> 200	Negativno (> 200)
Mliječna kiselina	50-21-5	Tekućina	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Potpuni medij	> 200	Negativno (> 200)
Salicilna kiselina	69-72-7	Kruta tvar	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	DMSO	> 200	Negativno (> 200)

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima

⁽¹⁾ Predviđanje opasnosti (i jakosti) *in vivo* temelji se na podacima dobivenima s pomoću analize LLNA (1. i 8.). Jakost *in vivo* utvrđena je prema kriterijima koje je predložio ECETOC (17.).

⁽²⁾ Na temelju vrijednosti uočenih u prijašnjim ispitivanjima (1. i 8.).

⁽³⁾ Potpuni medij: medij RPMI-1640 obogaćen s 10 % fetalnog telećeg seruma, 2 mM L-glutamina, 100 jedinica/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina (8.).

Dodatak 3.

IZAZIVANJE PREOSJETLJIVOSTI KOŽE IN VITRO: TEST IL-8 LUC

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

1. Za razliku od testova u kojima se analizira ekspresija staničnih površinskih biljega, testom IL8-Luc kvantificiraju se promjene u ekspresiji IL-8, citokina povezanog s aktiviranjem dendritičnih stanica (DC). Kod IL-8 reporterske stanične linije dobivene iz THP-1 (THP-G8, dobivena iz ljudske stanične linije akutne monocitne leukemije THP-1) ekspresija IL-8 mjeri se nakon izlaganja tvarima koje izazivaju preosjetljivost (1.). Ekspresija luciferaze zatim se upotrebljava kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost.
2. Test IL-8 Luc ocijenjen je u validacijskoj studiji (2.) koju su proveli JaCVAM (Japanski centar za validaciju alternativnih metoda), METI (**Ministarstvo gospodarstva, trgovine i industrije**) i JSAE (**Japansko društvo za alternative pokusima na životinjama**) te je kasnije podvrgnut neovisnom stručnom pregledu (3.) pod pokroviteljstvom JaCVAM-a i Ministarstva zdravlja, rada i dobrobiti, uz potporu **Međunarodne suradnje u području alternativnih metoda ispitivanja** (ICATM). Uzimajući u obzir sve dostupne dokaze i informacije regulatornih tijela i dionika, test IL-8 Luc smatra se korisnim kao dio IATA-e kao pomoć u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost u svrhu razvrstavanja i označavanja prema opasnosti. U literaturi su navedeni primjeri upotrebe podataka dobivenih testom IL-8 Luc u kombinaciji s ostalim informacijama (4., 5. i 6.).
3. Pokazalo se da se test IL-8 Luc može prenijeti u laboratorije koji imaju iskustva sa staničnim kulturama i mjerenjem luciferaze. Obnovljivost unutar jednog laboratorija iznosila je 87,7 %, a između laboratorija 87,5 % (2.). Podaci dobiveni u validacijskoj studiji (2.) i drugim objavljenim radovima (1. i 6.) pokazuju da je testom IL-8 Luc, u usporedbi s analizom LLNA, 118 kemikalija od njih 143 procijenjeno kao pozitivno ili negativno, a 25 kemikalija kao nejednoznačno te točnost testa IL-8 Luc u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože (kategorija 1. prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost (bez kategorije prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) iznosi 86 % (101/118), uz osjetljivost od 96 % (92/96) i specifičnost od 41 % (9/22). Isključujući tvari izvan područja primjene opisane u nastavku (stavak 5.), testom IL-8 Luc 113 kemikalija od njih 136 procijenjeno je kao pozitivno ili negativno, a 23 kemikalije kao nejednoznačno te točnost testa IL-8 Luc iznosi 89 % (101/113), uz osjetljivost od 96 % (92/96) i specifičnost od 53 % (9/17). Upotrebom podataka dobivenih na ljudima koji su navedeni u Urbisch i dr. (7.), testom IL-8 Luc 76 kemikalija od njih 90 procijenjeno je kao pozitivno ili negativno, a 14 kemikalija kao nejednoznačno te točnost testa iznosi 80 % (61/76), osjetljivost 93 % (54/58), a specifičnost 39 % (7/18). Isključujući tvari izvan područja primjene, testom IL-8 Luc 71 kemikalija od njih 84 procijenjeno je kao pozitivno ili negativno, a 13 kemikalija kao nejednoznačno te točnost testa iznosi 86 % (61/71), uz osjetljivost od 93 % (54/58) i specifičnost od 54 % (7/13). Veća je vjerojatnost da će se testom IL-8 Luc dobiti lažno negativna predviđanja za kemikalije koje pokazuju nisku/umjerenu jakost u izazivanju preosjetljivosti kože (potkategorija 1.B prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) nego za kemikalije koje pokazuju visoku jakost (potkategorija 1.A prema sustavu UN GHS/Uredbi o CLP-u) (6.). Navedene informacije idu u prilog upotrebi testa IL-8 Luc kao elementa koji pridonosi identifikaciji opasnosti od izazivanja preosjetljivosti kože. Točnost navedena za test IL-8 Luc kao samostalno ispitivanje služi samo kao smjernica jer je ispitivanje potrebno kombinirati s drugim izvorima informacija u kontekstu IATA-e te u skladu s odredbama stavaka 7. i 8. iz odjeljka „Opći uvod”. Nadalje, pri ocjenjivanju ispitivanja izazivanja preosjetljivosti kože koje ne uključuju pokuse na životinjama potrebno je imati na umu da analiza LLNA i druga ispitivanja na životinjama možda neće u potpunosti odražavati situaciju kod ljudi.
4. Trenutačno dostupni podaci pokazuju da se test IL-8 Luc može primijeniti za ispitivanje kemikalija koje obuhvaćaju različite organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, jakosti u izazivanju preosjetljivosti kože (kako su utvrđene istraživanjima *in vivo*) te fizikalno-kemijska svojstva (2. i 6.).

5. Iako se u testu IL-8 Luc kao otapalo upotrebljava X-VIVO™ 15, njime su točno ocijenjene kemikalije čija je vrijednost $\text{Log } K_{ow} > 3,5$ i čija je topljivost u vodi približno 100 µg/ ml, kako je izračunano programom EPI Suite™, te je njegova uspješnost u otkrivanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože i koje su slabo topljive u vodi bolja nego kod testa IL-8 Luc u kojem se kao otapalo upotrebljava dimetil sulfoksid (DMSO) (2.). Međutim, negativni rezultati za ispitivane kemikalije koje se ne otapaju pri koncentraciji od 20 mg/ml mogu dati lažno negativne rezultate jer se one ne mogu otopiti u otapalu X-VIVO™ 15. Stoga negativne rezultate za te ispitivane kemikalije ne treba razmatrati. U validacijskoj studiji uočen je visok udio lažno negativnih rezultata za anhidride. Nadalje, zbog ograničene metaboličke sposobnosti stanične linije (8.) i uvjeta pokusa prohapteni (tj. tvari koje zahtijevaju metaboličku aktivaciju) i prehapteni (tj. tvari koje se aktiviraju zračnom oksidacijom) mogu dati negativne rezultate u testu. Međutim, iako negativne rezultate za tvari za koje se sumnja da su prehapteni ili prohapteni treba tumačiti s oprezom, testom IL-8 Luc točno je procijenjeno 11 prehaptena od njih 11, šest od šest prohaptena te šest od osam prehaptena i prohaptena u podatkovnom skupu testa IL-8 Luc (2.). Na temelju nedavnog sveobuhvatnog pregleda triju ispitivanja koja ne uključuju pokuse na životinjama (DPRA, KeratinoSens™ i h-CLAT) za otkrivanje prehaptena i prohaptena (9.) te na temelju činjenice da su stanice THP-G8 koje se upotrebljavaju u testu IL-8 Luc stanična linija izvedena iz stanične linije THP-1 koja se upotrebljava u testu h-CLAT, test IL-8 Luc može pridonijeti i povećanju osjetljivosti ispitivanja koja ne uključuju pokuse na životinjama za otkrivanje prehaptena i prohaptena u kombinaciji s drugim ispitivanjima. Površinski aktivne tvari koje su dosad ispitane dale su (lažno) pozitivne rezultate neovisno o njihovoj vrsti (npr. kationske, anionske ili neionske). Naposljetku, kemikalije koje ometaju luciferazu mogu poremetiti njezinu aktivnost/mjerenje tako da uzrokuju prividnu inhibiciju ili povećanu luminiscenciju (10.). Na primjer, postoje izvješća o tome da su koncentracije fitoestrogena veće od 1 µM u drugim luciferaznim testovima ometale signale luminiscencije zbog pretjerane aktivacije reporterskog gena za luciferazu. Stoga je potrebno pažljivo ispitati ekspresiju luciferaze dobivenu pri visokim koncentracijama fitoestrogena ili spojeva za koje se pretpostavlja da dovode do aktivacije reporterskog gena za luciferazu slične aktivaciji fitoestrogenom (11.). Na temelju prethodno navedenog, površinski aktivne tvari, anhidridi i kemikalije koje ometaju luciferazu izvan su područja primjene ovog testa. U slučajevima u kojima se može dokazati da se test IL-8 Luc ne može primijeniti za ispitivanje drugih specifičnih kategorija kemikalija, taj test ne bi trebalo upotrebljavati za te specifične kategorije.
6. Kao što je opisano, test IL-8 Luc pomaže u razlikovanju tvari koje izazivaju preosjetljivost kože od tvari koje ne izazivaju preosjetljivost. Potreban je dodatan rad, po mogućnosti na temelju podataka dobivenih na ljudima, da bi se moglo utvrditi mogu li rezultati dobiveni testom IL-8 Luc pridonijeti procjeni jakosti ako se kombiniraju s drugim izvorima informacija.
7. Definicije su navedene u Dodatku 3.1.

NAČELO ISPITIVANJA

8. U testu IL-8 Luc upotrebljava se ljudska stanična linija monocitne leukemije THP-1, koja se nabavlja iz banke stanica American Type Culture Collection (Manassas, VA, SAD). Upotrebom te stanične linije na Odjelu za dermatologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Tohokuu (*Dept. of Dermatology, Tohoku University School of Medicine*) stvorena je stanična linija THP-G8, IL-8 reporterska stanična linija izvedena iz THP-1, koja nosi gene za stabilnu narančastu luciferazu (*Stable Luciferase Orange*; SLO) i stabilnu crvenu luciferazu (*Stable Luciferase Red*; SLR) koji su pod kontrolom promotora gena za IL-8 odnosno za gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazu (GAPDH) (1.). To omogućuje kvantitativno mjerenje indukcije gena za luciferazu određivanjem luminiscencije iz supstrata luciferaze za koje je poznato da stvaraju svjetlost, kao pokazatelja aktivnosti IL-8 i GAPDH-a u stanicama nakon izlaganja kemikalijama koje izazivaju preosjetljivost.
9. Ispitni sustav s dvije boje sastoji se od luciferaze koja emitira narančastu boju (SLO; $\lambda_{max} = 580 \text{ nm}$) (12.) za gensku ekspresiju s promotora gena za IL-8 te luciferaze koja emitira crvenu boju (SLR; $\lambda_{max} = 630 \text{ nm}$) (13.) za gensku ekspresiju s promotora gena za GAPDH kao interne kontrole. Dvije luciferaze emitiraju različite boje nakon reakcije s d-luciferinom krijesnice i njihova se luminiscencija mjeri istovremeno u reakciji u jednom koraku tako da se emisija iz smjese za testiranje podijeli upotrebom optičkog filtra (14.) (Dodatak 3.2.).

10. Stanice THP-G8 tretiraju se ispitivanom kemikalijom 16 sati, nakon čega se mjeri aktivnost SLO luciferaze (SLO-LA), koja odražava aktivnost promotora gena za IL-8, te aktivnost SLR luciferaze (SLR-LA), koja odražava aktivnost promotora gena za GAPDH. Kako bi se kratice lakše razumjele, SLO-LA i SLR-LA određuju se kao IL8LA odnosno GAPLA. U tablici 1. naveden je opis termina povezanih s aktivnošću luciferaze u testu IL-8 Luc. Izmjerene vrijednosti upotrebljavaju se za izračun normalizirane IL8LA (nIL8LA), odnosno omjera IL8LA i GAPLA, indukcije nIL8LA (Ind-IL8LA), odnosno omjera aritmetičke sredine četverostruko izmjerenih vrijednosti nIL8LA stanica THP-G8 tretiranih ispitivanom kemikalijom i vrijednosti nIL8LA netretiranih stanica THP-G8, te inhibicije GAPLA (Inh-GAPLA), odnosno omjera aritmetičke sredine četverostruko izmjerenih vrijednosti GAPLA stanica THP-G8 tretiranih ispitivanom kemikalijom i vrijednosti GAPLA netretiranih stanica THP-G8 te se upotrebljavaju kao pokazatelj citotoksičnosti.

Tablica 1.

Opis termina povezanih s aktivnošću luciferaze u testu IL-8 Luc

Kratice	Definicija
GAPLA	aktivnost SLR luciferaze koja odražava aktivnost promotora gena za GAPDH
IL8LA	aktivnost SLO luciferaze koja odražava aktivnost promotora gena za IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA stanica THP-G8 tretiranih kemikalijama / nIL8LA netretiranih stanica
Inh-GAPLA	GAPLA stanica THP-G8 tretiranih kemikalijama / GAPLA netretiranih stanica
CV05	najniža koncentracija kemikalije pri kojoj Inh-GAPLA postaje < 0,05

11. Dostupni su zahtjevi izvedbe (15.) radi olakšavanja validacije izmijenjenih *in vitro* testova IL-8 s luciferazom sličnih testu IL-8 Luc te omogućivanja pravovremene izmjene Smjernice OECD-a za ispitivanje 442E radi njihova uključivanja. OECD-ovo uzajamno prihvaćanje podataka jamči se samo za ispitivanja koja su validirana u skladu sa zahtjevima izvedbe ako je OECD pregledao ta ispitivanja i uključio ih u Smjernicu OECD-a za ispitivanje 442E (16.).

DOKAZIVANJE OSPOSOBLJENOSTI

12. Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost upotrebom deset tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti navedenih u Dodatku 3.3. u skladu s dobrom praksom za *in vitro* metode (17.). Osim toga, korisnici ispitivanja trebaju održavati bazu prijašnjih podataka dobivenih provjerama reaktivnosti (vidjeti stavak 15.) te s pozitivnim kontrolama i kontrolama s otapalom/nosačem (vidjeti stavke od 21. do 24.) i trebaju se koristiti tim podacima kako bi potvrdili da je njihov laboratorij održao obnovljivost ispitivanja tijekom vremena.

POSTUPAK

13. Dostupni su standardni operativni postupci (SOP) za test IL-8 Luc te bi ih trebalo primjenjivati pri provedbi ispitivanja (18.). Laboratoriji koji su spremni provoditi ispitivanje mogu nabaviti rekombinantnu staničnu liniju

THP-G8 od laboratorija GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, nakon što potpišu sporazum o prijenosu materijala (MTA) u skladu s uvjetima iz OECD-ova predloška. U sljedećim stavcima opisuju se glavne sastavnice i postupci testa.

Priprema stanica

14. Za provedbu testa IL-8 Luc treba upotrebljavati staničnu liniju THP-G8 iz laboratorija GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan (vidjeti stavke 8. i 13.). Nakon primitka stanice se razmnožavaju (od dvije do četiri pasaže) te čuvaju zamrznute kao homogena zaliha. Stanice iz te zalihe mogu se razmnožavati do najviše 12 pasaža ili najdulje šest tjedana. Za razmnožavanje se kao medij upotrebljava RPMI-1640, medij za uzgoj kulture koji sadržava 10 % fetalnog govedeg seruma (FBS), otopinu antibiotika/antimikotika (100 jedinica/ml penicilina G, 100 µg/ml streptomicina i 0,25 µg/ml amfotericina B u 0,85-postotnoj fiziološkoj otopini) (npr. GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml puromicina (npr. CAS: 58-58-2) i 300 µg/ml G418 (npr. CAS: 108321-42-2).
15. Prije upotrebe za ispitivanje treba provjeriti ispunjavaju li stanice zadane kriterije provjerom reaktivnosti. Tu provjeru treba provesti od jedan do dva tjedna ili od dvije do četiri pasaže nakon odmrzavanja, upotrebom pozitivne kontrole, 4-nitrobenzil bromida (4-NBB) (CAS: 100-11-8, čistoća ≥ 99 %) i negativne kontrole, mliječne kiseline (LA) (CAS: 50-21-5, čistoća ≥ 85 %). 4-NBB trebao bi dati pozitivan odgovor na Ind-IL8LA (≥ 1,4), dok bi LA trebao dati negativan odgovor na Ind-IL8LA (< 1,4). Za test se upotrebljavaju samo stanice koje su prošle provjeru reaktivnosti. Provjeru treba provesti u skladu s postupcima opisanim u stavcima od 22. do 24.
16. Za ispitivanje se stanice THP-G8 nasaduju pri gustoći od 2 do 5×10^5 stanica/ml te se prethodno uzgajaju u tikvicama s kulturom od 48 do 96 sati. Na dan ispitivanja stanice izdvojene iz tikvice s kulturom ispiru se medijem RPMI-1640 koji sadržava 10 % FBS-a bez antibiotika, a zatim se ponovno suspendiraju medijem RPMI-1640 koji sadržava 10 % FBS-a bez antibiotika pri gustoći od 1×10^6 stanica/ml. Stanice se zatim distribuiraju na crnu ploču s 96 jažica s ravnim dnom (npr. Costar Cat#3603) s 50 µl (5×10^4 stanica/jažici).

Priprema ispitivane kemikalije i kontrolnih tvari

17. Ispitivana kemikalija i kontrolne tvari pripremaju se na dan ispitivanja. Za test IL-8 Luc ispitivane kemikalije otapaju se u mediju X-VIVOTM 15, komercijalno dostupnom mediju bez seruma (Lonza, 04-418Q), tako da se dobije konačna koncentracija od 20 mg/ml. X-VIVOTM 15 dodaje se u 20 mg ispitivane kemikalije (neovisno o topljivosti kemikalije) u epruvetu za mikrocentrifugu i dovodi do volumena od 1 ml, a zatim se snažno vrtložno protresa i trese u rotoru pri najvećoj brzini od 8 o/min 30 minuta na sobnoj temperaturi od približno 20 °C. Nadalje, ako su kemikalije u krutom stanju i dalje netopljive, epruveta se ultrazvučno obrađuje dok se kemikalija potpuno ne otopi ili stabilno dispergira. Ako su ispitivane kemikalije topljive u mediju X-VIVOTM 15, otopina se razrjeđuje medijem X-VIVOTM 15 primjenom faktora razrjeđivanja od pet te se upotrebljava kao glavna otopina X-VIVOTM 15 ispitivane kemikalije (4 mg/ml). Ako ispitivana kemikalija nije topljiva u mediju X-VIVOTM 15, smjesa se ponovno protresa najmanje 30 minuta, a zatim se centrifugira pri 15000 o/min (≈ 20 000g) u trajanju od pet minuta; supernatant koji nastane upotrebljava se kao glavna otopina X-VIVOTM 15 ispitivane kemikalije. Upotrebu drugih otapala, kao što su DMSO, voda ili medij za uzgoj kulture, treba znanstveno obrazložiti. Podroban postupak za otapanje kemikalija prikazan je u Dodatku 3.5. Otopine medija X-VIVOTM 15 opisane u stavcima od 18. do 23. miješaju se u omjeru 1: 1 (v/v) sa suspenzijama stanica pripremljenima na crnoj ploči s 96 jažica s ravnim dnom (vidjeti stavak 16.).
18. Prvi ciklus ispitivanja usmjeren je na utvrđivanje citotoksične koncentracije i ispitivanje potencijala kemikalija da izazovu preosjetljivost kože. Upotrebom medija X-VIVOTM 15, serijska razrjeđivanja glavne otopine X-VIVOTM 15 ispitivanih kemikalija prave se s faktorom razrjeđivanja od dva (vidjeti Dodatak 3.5.) upotrebom ploče za test s 96 jažica (npr. Costar Cat#EW-01729-03). Zatim se 50 µl/jažici razrijeđene otopine dodaje u 50 µl suspenzije stanica na crnoj ploči s 96 jažica s ravnim dnom. Stoga su konačne koncentracije ispitivanih kemikalija koje su topljive u mediju X-VIVOTM 15 u rasponu od 0,002 do 2 mg/ml (Dodatak 3.5.). U slučaju ispitivanih kemikalija koje nisu topljive u mediju X-VIVOTM 15 pri 20 mg/ml utvrđuju se samo faktori razrjeđivanja u rasponu od 2 do 2^{10} , iako stvarne konačne koncentracije ispitivanih kemikalija ostaju nesigurne i ovise o zasićenoj koncentraciji ispitivane kemikalije u glavnoj otopini medija X-VIVOTM 15.

19. U kasnijim ciklusima ispitivanja (tj. drugom, trećem i četvrtom ponavljanju), glavna otopina medija X-VIVO™ 15 pravi se pri koncentraciji koja je četiri puta viša od koncentracije vijabilnosti stanica 05 (CV05; najniža koncentracija pri kojoj Inh-GAPLA postaje $< 0,05$) u prvom pokusu. Ako Inh-GAPLA ne postane manji od 0,05 pri najvišoj koncentraciji u prvom ciklusu, glavna otopina medija X-VIVO™ 15 pravi se upotrebom najviše koncentracije prvog ciklusa. Koncentracija CV05 računa se tako da se koncentracija glavne otopine u prvom ciklusu podijeli faktorom razrjeđivanja za CV05 (X) (faktor razrjeđivanja CV05 (X); faktor razrjeđivanja potreban za razrjeđivanje glavne otopine na CV05) (vidjeti Dodatak 3.5.). Za ispitivane tvari koje nisu topljive u mediju X-VIVO pri 20 mg/ml, CV05 se utvrđuje koncentracijom glavne otopine $\times 1/X$. Za cikluse od drugog do četvrtog priprema se druga glavna otopina kao $4 \times CV05$ (Dodatak 3.5.).
20. Serijska razrjeđivanja drugih glavnih otopina X-VIVO™ 15 prave se upotrebom faktora razrjeđivanja od 1,5 upotrebom ploče za test s 96 jažica. Zatim se 50 μ l/jažici razrjeđene otopine dodaje u 50 μ l suspenzije stanica u jažicama crne ploče s 96 jažica s ravnim dnom. Svaku koncentraciju svake ispitivane kemikalije treba ispitati u četiri jažice. Uzorci se zatim miješaju u jedinici za miješanje za ploče i inkubiraju 16 sati na 37 °C i s 5 % CO₂, nakon čega se mjeri aktivnost luciferaze kako je opisano u nastavku.
21. Kontrolu s otapalom čini smjesa 50 μ l/jažici medija X-VIVO™ 15 i 50 μ l/jažici suspenzije stanica u mediju RPMI-1640 koji sadržava 10 % FBS-a.
22. Kao pozitivna kontrola preporučuje se 4-NBB. Priprema se 20 mg 4-NBB-a u epruveti za mikrocentrifugu od 1,5 ml, u koju se dodaje medij X-VIVO™ 15 do volumena od 1 ml. Epruveta se snažno vrtložno protresa i trese u rotoru pri najvećoj brzini od 8 o/min najmanje 30 minuta. Nakon centrifugiranja pri 20 000 g tijekom pet minuta supernatant se razrjeđuje faktorom od 4 medijem X-VIVO™ 15 i 500 μ l razrijeđenog supernatanta prenosi se u jažicu na ploči za test s 96 jažica. Razrijeđeni supernatant dodatno se razrjeđuje medijem X-VIVO™ 15 s faktorima razrjeđivanja od 2 i 4 te se 50 μ l otopine dodaje u 50 μ l suspenzije stanica THP-G8 u jažicama crne ploče s 96 jažica s ravnim dnom (Dodatak 3.6.). Svaku koncentraciju pozitivne kontrole treba ispitati u četiri jažice. Ploča se trese u jedinici za miješanje za ploče i inkubira 16 sati u inkubatoru CO₂ (37 °C, 5 % CO₂), nakon čega se mjeri aktivnost luciferaze kako je opisano u stavku 29.
23. Kao negativna kontrola preporučuje se mliječna kiselina. Priprema se 20 mg mliječne kiseline u epruveti za mikrocentrifugu od 1,5 ml, u koju se dodaje medij X-VIVO™ 15 do volumena od 1 ml (20 mg/ml). Dvadeset mg/ml otopine mliječne kiseline razrjeđuje se medijem X-VIVO™ 15 primjenom faktora od 5 (4 mg/ml); 500 μ l od tih 4 mg/ml otopine mliječne kiseline prenosi se u jažicu ploče za test s 96 jažica. Ta se otopina razrjeđuje medijem X-VIVO™ 15 primjenom faktora od 2 te se ponovno razrjeđuje primjenom faktora od 2 kako bi se dobile otopine od 2 mg/ml i 1 mg/ml. 50 μ l tih triju otopina i kontrole s nosačem (X-VIVO™ 15) dodaje se u 50 μ l suspenzije stanica THP-G8 u jažicama crne ploče s 96 jažica s ravnim dnom. Svaka koncentracija negativne kontrole ispituje se u četiri jažice. Ploča se trese u jedinici za miješanje za ploče i inkubira 16 sati u inkubatoru s CO₂ (37 °C, 5 % CO₂), nakon čega se mjeri aktivnost luciferaze kako je opisano u stavku 29.
24. Mogu se upotrijebiti druge prikladne pozitivne ili negativne kontrole pod uvjetom da su dostupni prijašnji podaci na temelju kojih se mogu odrediti usporedivi kriteriji prihvatljivosti ciklusa.
25. Treba paziti da ne dođe do isparavanja hlapljivih ispitivanih kemikalija te unakrsne kontaminacije jažica ispitivanim kemikalijama, npr. zatvaranjem ploče prije inkubacije s ispitivanim kemikalijama.
26. Za ispitivane kemikalije i kontrolu s otapalom potrebna su od dva do četiri ciklusa kako bi se došlo do pozitivnog ili negativnog predviđanja (vidjeti tablicu 2.). Svaki ciklus provodi se na različite dane sa svježom glavnom otopinom medija X-VIVO™ 15 ispitivanih kemikalija i neovisno izdvojenim stanicama. Stanice mogu biti iz iste pasaže.

Mjerenja aktivnosti luciferaze

27. Luminiscencija se mjeri luminometrom za mikrotitracijsku ploču s 96 jažica s optičkim filtrima, npr. Phelios (ATTO, Tokio, Japan), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Njemačka) i serijom ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD). Luminometar se mora kalibrirati za svako ispitivanje kako bi se osigurala obnovljivost (19.). Za tu su kalibraciju dostupne rekombinantne luciferaze koje emitiraju narančastu i crvenu svjetlost.
28. U svaku jažicu ploče na kojoj se nalazi suspenzija stanica tretirana kemikalijama ili bez kemikalija prenosi se 100 μ l prethodno zagrijanog reagensa za test luciferaze Tripluc® (Tripluc). Ploča se protresa deset minuta na sobnoj temperaturi od približno 20 °C. Ploča se stavlja u luminometar kako bi se izmjerila aktivnost luciferaze. Bioluminiscencija se mjeri tri sekunde bez optičkog filtra (F0) i tri sekunde s optičkim filtrom (F1). Treba pružiti obrazloženje za upotrebu drugačijih postavki, npr. ovisno o modelu luminometra koji se upotrebljava.
29. Parametri za svaku koncentraciju računaju se iz izmjerenih vrijednosti, npr. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, srednja vrijednost $\pm$ SD za IL8LA, srednja vrijednost $\pm$ SD za GAPLA, srednja vrijednost $\pm$ SD za nIL8LA, srednja vrijednost $\pm$ SD za Ind-IL8LA, srednja vrijednost $\pm$ SD za Inh-GAPLA i interval pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA. Definicije parametara upotrijebljenih u ovom stavku navedene su u dodacima 3.1. i 3.4.
30. Prije mjerenja razlikovanje boja u reporterskim testovima s više boja obično se postiže upotrebom detektora (luminometar i čitač ploča) koji imaju optičke filtre, kao što su filtri s oštrom graničnom crtom valne duljine (dugo ili kratko prolazni) ili pojasno propusni filtri. Koeficijente prijenosa filtara za svaku signalnu boju bioluminiscencije treba kalibrirati prije ispitivanja, u skladu s Dodatkom 3.2.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Procjena podataka

31. Sljedeći kriteriji moraju se ispuniti u svakom ciklusu da bi se donijela pozitivna/negativna odluka:
 - predviđanje na temelju testa IL-8 Luc smatra se pozitivnim ako je Ind-IL8LA ispitivane kemikalije $\geq 1,4$ i donja granica intervala pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA $\geq 1,0$,
 - predviđanje na temelju testa IL-8 Luc smatra se negativnim ako je Ind-IL8LA ispitivane kemikalije $< 1,4$ i/ili donja granica intervala pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA $< 1,0$.

Model predviđanja

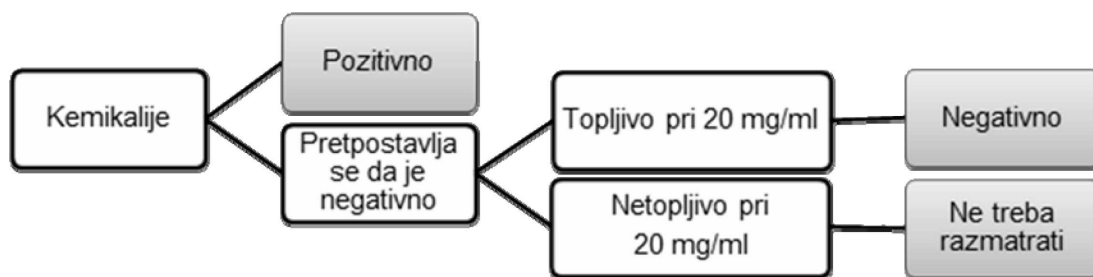
32. Ispitivane kemikalije koje daju dva pozitivna rezultata u 1., 2., 3. i 4. ciklusu identificiraju se kao pozitivne, dok se one koje daju tri negativna rezultata u 1., 2., 3. i 4. ciklusu identificiraju kao kemikalije za koje se pretpostavlja da su negativne (tablica 2.). Među kemikalijama za koje se pretpostavlja da su negativne, kemikalije koje se otapaju pri 20 mg/ml medija X-VIVO™ 15 procjenjuju se kao negativne, dok kemikalije koje se ne otapaju pri 20 mg/ml medija X-VIVO™ 15 ne treba razmatrati (slika 1.).

Tablica 2.

Kriteriji za identifikaciju pozitivnih i pretpostavljenih negativnih rezultata

1. ciklus	2. ciklus	3. ciklus	4. ciklus	Konačno predviđanje
Pozitivno	Pozitivno	–	–	Pozitivno
	Negativno	Pozitivno	–	Pozitivno
		Negativno	Pozitivno	Pozitivno
			Negativno	Pretpostavlja se da je negativno
Negativno	Pozitivno	Pozitivno	–	Pozitivno
		Negativno	Pozitivno	Pozitivno
			Negativno	Pretpostavlja se da je negativno
	Negativno	Pozitivno	Pozitivno	Pozitivno
			Negativno	Pretpostavlja se da je negativno
		Negativno	–	Pretpostavlja se da je negativno

Slika 1.

Model predviđanja za konačnu odluku**Kriteriji prihvatljivosti**

33. Sljedeći bi kriteriji prihvatljivosti trebali biti ispunjeni kada se primjenjuje test IL-8 Luc:

- Ind-IL8LA treba biti veći od 5,0 pri barem jednoj koncentraciji pozitivne kontrole, 4-NBB-a, u svakom ciklusu,
- Ind-IL8LA treba biti manji od 1,4 pri bilo kojoj koncentraciji negativne kontrole, mliječne kiseline, u svakom ciklusu,

- treba odbaciti podatke s ploča za koje je GAPLA kontrolnih jažica sa stanicama i Triplucom, ali bez kemikalija, za manje od pet puta veća od GAPLA jažica koje sadržavaju samo ispitni medij (50 µl/jažici medija RPMI-1640 koji sadržava 10 % FBS-a i 50 µl/jažici medija X-VIVO™ 15),
- treba odbaciti podatke s ploča za koje je Inh-GAPLA svih koncentracija ispitivanih ili kontrolnih kemikalija manja od 0,05. U tom slučaju treba ponoviti prvo ispitivanje tako da se kao najviša konačna koncentracija ponovljenog ispitivanja upotrijebi najniža konačna koncentracija prethodnog ispitivanja.

Izvješće o ispitivanju

34. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivane kemikalije

Tvar s jednim sastojkom:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- fizički izgled, topljivost u vodi, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- topljivost u mediju X-VIVO™ 15. U slučaju kemikalija koje nisu topljive u mediju X-VIVO™ 15, je li nakon centrifugiranja uočeno taloženje ili plutanje,
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju ako nije upotrijebljen X-VIVO™ 15.

Tvar s više sastojaka, UVCB tvar i smjesa:

- opisane koliko god je to moguće npr. kemijskim identitetom (vidjeti prethodno), čistoćom, količinskom zastupljenošću i relevantnim fizikalno-kemijskim svojstvima sastojaka (vidjeti prethodno), u mjeri u kojoj su podaci dostupni,

- fizički izgled, topljivost u vodi te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- molekularna masa ili prividna molekularna masa u slučaju smjesa/polimera poznatog sastava ili druge informacije koje su relevantne za provođenje studije,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- topljivost u mediju X-VIVO™ 15. U slučaju kemikalija koje nisu topljive u mediju X-VIVO™ 15, je li nakon centrifugiranja uočeno taloženje ili plutanje,
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala/nosača za svaku ispitivanu kemikaliju ako nije upotrijebljen X-VIVO™ 15.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi), SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula i/ili druge identifikacijske oznake,
- fizički izgled, topljivost u vodi, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva, u mjeri u kojoj su podaci dostupni i ako je primjenjivo,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,
- obrada prije ispitivanja, prema potrebi (npr. zagrijavanje, usitnjavanje),
- ispitana koncentracija (ispitane koncentracije),
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- upućivanje na rezultate koji se odnose na prijašnje pozitivne kontrole i pokazuju primjerenost kriterija prihvatljivosti, ako je primjenjivo.

Negativna kontrola:

- kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv(i), CAS broj(evi) i/ili druge identifikacijske oznake,
- čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd.,

- fizički izgled, molekularna masa te dodatna relevantna fizikalno-kemijska svojstva u slučaju da su upotrijebljene negativne kontrole koje nisu navedene u smjernici za ispitivanje, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- uvjeti skladištenja i stabilnost, u mjeri u kojoj su podaci dostupni,
- obrazloženje za odabir otapala za svaku ispitivanu kemikaliju.

Ispitni uvjeti:

- naziv i adresa naručitelja, ustanove koja provodi ispitivanje i voditelja istraživanja,
- opis upotrijebljenog ispitivanja,
- upotrijebljena stanična linija, uvjeti njezina skladištenja i izvor (npr. objekt iz kojeg je dobivena),
- broj serije i podrijetlo FBS-a, naziv dobavljača, broj serije crne ploče s 96 jažica s ravnim dnom te broj serije reagensa Tripluc,
- broj pasaža i gustoća stanica upotrijebljenih za ispitivanje,
- metoda brojenja stanica koja je upotrijebljena za nasađivanje prije ispitivanja i mjere koje su poduzete kako bi se osigurala ujednačena distribucija broja stanica,
- upotrijebljeni luminometar (npr. model), uključujući postavke instrumenta, upotrijebljeni supstrat luciferaze te dokaz o primjerenom mjerenju luminiscencije na temelju kontrolnog ispitivanja opisanog u Dodatku 3.2.,
- postupak koji je primijenjen za dokazivanje osposobljenosti laboratorija za izvođenje ispitivanja (npr. ispitivanjem tvari koje služe za dokazivanje osposobljenosti) ili za dokazivanje obnovljive primjene ispitivanja tijekom vremena.

Ispitni postupak:

- broj provedenih ponavljanja i ciklusa,
- koncentracije ispitivane kemikalije, postupci primjene i vrijeme izloženosti (ako je drukčije od preporučenog),
- opis primijenjenih kriterija ocjenjivanja i odlučivanja,
- opis primijenjenih kriterija prihvatljivosti istraživanja,
- opis mogućih izmjena ispitnog postupka.

Rezultati:

- mjerenje IL8LA i GAPLA,
- izračuni za nIL8LA, Ind-IL8LA i Inh-GAPLA,
- interval pouzdanosti od 95 % za Ind-IL8LA,
- grafički prikaz krivulja doza – odgovor za indukciju aktivnosti luciferaze i vijabilnost,
- opis svih drugih relevantnih opažanja, ako je primjenjivo.

Rasprava o rezultatima:

- rasprava o rezultatima dobivenima testom IL-8 Luc,
- rasprava o rezultatima testa u kontekstu IATA-e ako su dostupni drugi relevantni podaci.

*Zaključak***LITERATURA**

1. Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
2. OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
3. OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
4. OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

5. van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371.–9.
6. Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816.–30.
7. Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337.–51.
8. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 38:275.–84.
9. Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? *Regul Toxicol Pharmacol*, 82:147.–155.
10. Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem Biol* 17:646.–57.
11. OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Pariz. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
12. Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1286.–91.
13. Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38:8271.–9.
14. Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques* 38:891.–4.
15. OECD (2017). Objavit će se – Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Pariz, Francuska.

16. OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Pariz, Francuska.

17. OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz. Dostupno na: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.

18. JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Dostupno na: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

19. Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046.–9.

20. OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Pariz, Francuska.

21. Ujedinjeni narodi (2015.). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Dostupno na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Dodatak 3.1.

DEFINICIJE

Točnost: stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćenih referentnih vrijednosti. Ona je mjerilo učinkovitosti ispitivanja i jedan od aspekata relevantnosti. Pojam je često međusobno zamjenjiv s pojmom „podudarnost” u smislu udjela točnih ishoda ispitivanja (16.).

AOP (engl. *Adverse Outcome Pathway* – put nastanka štetnog ishoda): slijed događaja od kemijske strukture ciljne kemikalije ili skupine sličnih kemikalija preko početnog molekularnog događaja do *in vivo* štetnog ishoda (20.).

Kemikalija: tvar ili smjesa.

CV05: vijabilnost stanica 05, tj. najmanja koncentracija pri kojoj kemikalije pokazuju Inh-GAPLA manji od 0,05.

FluSLO-LA: kratica koja se upotrebljava u validacijskom izvješću i prethodnim publikacijama o testu IL-8 Luc za označavanje Ind-IL8LA. Vidjeti „Ind-IL8LA” za definiciju.

GAPLA: aktivnost stabilne crvene luciferaze (SLR) ($\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$), koju regulira promotor gena za GAPDH i koja pokazuje vijabilnost stanica i broj živih stanica.

Opasnost: intrinzično svojstvo nekog agensa ili stanje koje ima potencijal uzrokovanja štetnih učinaka kada su organizam, sustav ili (sub)populacija izloženi tom agensu.

IATA (engl. *Integrated Approach to Testing and Assessment integrirani pristup ispitivanju i procjeni*): strukturiran pristup koji se primjenjuje za identifikaciju opasnosti (potencijal), karakterizaciju opasnosti (jakost) i/ili procjenu sigurnosti (potencijal/jakost i izloženost) kemikalije ili skupine kemikalija, kojim se na strateški način objedinjuju i ponderiraju svi relevantni podaci koji će služiti kao podloga za donošenje regulatornih odluka u vezi s potencijalnom opasnošću i/ili rizikom i/ili potrebom za daljnjim ciljnim, a time i minimalnim ispitivanjem.

II-SLR-LA: kratica koja se upotrebljava u validacijskom izvješću i prethodnim publikacijama o testu IL-8 Luc za označavanje Inh-GAPLA. Vidjeti „Inh-GAPLA” za definiciju.

IL-8 (Interleukin-8): citokin izveden iz endotelnih stanica, fibroblasta, keratinocita, makrofaga i monocita koji uzrokuje kemotaksiju neutrofila i limfocita T-stanica.

IL8LA: aktivnost stabilne narančaste luciferaze (SLO) ($\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$), koju regulira promotor gena za IL-8.

Ind-IL8LA: multiplikacijski faktor indukcije nIL8LA. Dobiva se tako da se nIL8LA stanica THP-G8 tretiranih kemikalijama podijeli s nIL8LA stanica THP-G8 koje nisu stimulirane te predstavlja aktivnost promotora gena za IL-8 koju induciraju kemikalije.

Inh-GAPLA: inhibicija GAPLA. Dobiva se tako da se GAPLA stanica THP-G8 tretiranih kemikalijama podijeli s GAPLA stanica THP-G8 koje nisu tretirane te predstavlja citotoksičnost kemikalija.

Prag najmanje indukcije (MIT): najniža koncentracija pri kojoj kemikalija ispunjava pozitivne kriterije.

Smjesa: smjesa ili otopina koja se sastoji od dviju ili više tvari.

Tvar s jednim sastojkom: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je jedan glavni sastojak prisutan u koncentraciji od najmanje 80 % (w/w).

Tvar s više sastojaka: tvar, definirana količinskim sastavom, u kojoj je više od jednog glavnog sastojka prisutno u koncentraciji od 10 % ili većoj (w/w) te manjoj od 80 % (w/w). Tvar s više sastojaka rezultat je procesa proizvodnje. Smjesa i tvar s više sastojaka razlikuju se po tome što se smjesa dobiva miješanjem dviju ili više tvari bez kemijske reakcije. Tvar s više sastojaka rezultat je kemijske reakcije.

nIL8LA: aktivnost luciferaze SLO koja odražava aktivnost promotora gena za IL-8 (IL8LA) normalizirana aktivnošću luciferaze SLR koja odražava aktivnost promotora gena za GAPDH (GAPLA). To je aktivnost promotora gena za IL-8 nakon što se uzme u obzir vijabilnost stanica ili broj stanica.

nSLO-LA: kratica koja se upotrebljava u validacijskom izvješću i prethodnim publikacijama o testu IL-8 Luc za označivanje nIL8LA. Vidjeti „nIL8LA” za definiciju.

Pozitivna kontrola: ponovljeni uzorak koji sadržava sve komponente ispitnog sustava i tretiran je s tvari za koju je poznato da izaziva pozitivan odgovor. Kako bi se osigurala mogućnost procjene varijabilnosti odgovora pozitivne kontrole tijekom vremena, pozitivan odgovor ne bi smio biti presnažan.

Prehapteni: kemikalije koje abiotičkom pretvorbom postaju tvari koje izazivaju preosjetljivost.

Prohapteni: kemikalije kojima je potrebna enzimaska aktivacija da bi mogle pokazati potencijal izazivanja preosjetljivosti kože.

Relevantnost: opis odnosa između ispitivanja i istraživanih učinka te je li ispitivanje prikladno i korisno za određenu svrhu. Pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanjem točno mjeri ili predviđa istraživani biološki učinak. Relevantnost uključuje i razmatranje o točnosti (podudarnosti) ispitivanja (16.).

Pouzdanost: pokazuje u kojoj se mjeri ispitivanje može obnovljivo primijeniti unutar jednog laboratorija i između više laboratorija tijekom vremena uz primjenu istog protokola. Ocjenjuje se izračunavanjem obnovljivosti unutar jednog laboratorija i između više njih te ponovljivosti unutar jednog laboratorija (16.).

Ciklus: ciklus se sastoji od jedne ispitivane kemikalije ili više njih koje se ispituju istodobno s kontrolom s otapalom/nosačem i pozitivnom kontrolom.

Osjetljivost: udio svih pozitivnih/aktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (16.).

SLO-LA: kratica koja se upotrebljava u validacijskom izvješću i prethodnim publikacijama o testu IL-8 Luc za označivanje IL8LA. Vidjeti „IL8LA” za definiciju.

SLR-LA: kratica koja se upotrebljava u validacijskom izvješću i prethodnim publikacijama o testu IL-8 Luc za označivanje GAPLA. Vidjeti „GAPLA” za definiciju.

Kontrola s otapalom/nosačem: netretirani uzorak koji ne sadržava ispitivanu kemikaliju, ali sadržava sve ostale komponente ispitnog sustava te otapalo/nosač koji se upotrebljava u ispitivanju. Upotrebljava se za utvrđivanje polaznog odgovora za uzorke koji se tretiraju ispitivanom kemikalijom otopljenom ili stabilno dispergiranim u istom otapalu/nosaču. Kada se ispituje s istodobnom kontrolom s medijem, taj uzorak isto tako pokazuje je li otapalo/nosač u interakciji s ispitnim sustavom.

Specifičnost: udio svih negativnih/neaktivnih kemikalija koje su pravilno razvrstane primjenom ispitivanja. To je mjera točnosti ispitivanja koje daje kategorijske rezultate i važan je čimbenik za ocjenu relevantnosti ispitivanja (16.).

Tvar: kemijski elementi i njihovi spojevi u prirodnom stanju ili dobiveni proizvodnim postupkom, uključujući i dodatke (aditive) koji su nužni za održavanje stabilnosti proizvoda te nečistoće koje proizlaze iz primijenjenog postupka, ali isključujući otapala koja se mogu izdvojiti bez utjecaja na stabilnost tvari ili promjene njezina sastava.

Površinski aktivna tvar: tvar, kao npr. deterdžent, koju se naziva i površinski aktivnim agensom, kojom se može smanjiti površinska napetost tekućine i time omogućiti pjenjenje i prodiranje u krute tvari; poznata je i kao sredstvo za vlaženje (TG437).

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom metodom.

THP-G8: reporterska stanična linija IL-8 koja se upotrebljava u testu IL-8 Luc. Ljudska stanična linija THP-1 slična makrofagima transficirana je genima za luciferaze SLO i SLR pod kontrolom promotora gena za IL-8 i GAPDH.

Globalno usklađeni sustav Ujedinjenih naroda za razvrstavanje i označivanje kemikalija (UN GHS): sustav za razvrstavanje kemikalija (tvari i smjesa) prema standardiziranim vrstama i stupnjevima fizičkih opasnosti i opasnosti za zdravlje i okoliš, kojim su obuhvaćena odgovarajuća komunikacijska sredstva kao što su piktogrami, oznake opasnosti, oznake upozorenja, oznake obavijesti i sigurnosno-tehnički listovi, kojima se prenose informacije o njihovim štetnim učincima u cilju zaštite ljudi (uključujući poslodavce, radnike, prijevoznike, potrošače i interventno osoblje) i okoliša (21.).

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi i biološki materijali.

Valjana ispitna metoda: ispitivanje za koje se smatra da je dovoljno relevantno i pouzdano za određenu svrhu te koje se temelji na znanstveno utemeljenim načelima. Ispitivanje nikada nije valjano u apsolutnom smislu nego samo u odnosu na određenu svrhu.

Dodatak 3.2.

NAČELO MJERENJA AKTIVNOSTI LUCIFERAZE I UTVRĐIVANJE KOEFICIJENATA PRIJENOSA OPTIČKOG FILTRA ZA SLO I SLR

Može se upotrijebiti višereporterski ispitni sustav – Tripluc – s luminometrom za mikrotitracijske ploče koji ima višebojni detekcijski sustav na koji se može montirati optički filter (npr. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Kao optički filter za mjerenje može se upotrijebiti dugo ili kratko prolazni filter od 600 do 620 nm ili pojasno propusni filter od 600 do 700 nm.

Mjerenje dvobojnih luciferaza optičkim filtrom

U ovom se primjeru upotrebljava Phelios AB-2350 (ATTO). Taj je luminometar opremljen dugo prolaznim filtrom od 600 nm (R60 HOYA Co., 600 nm LP, filter 1) za razdvajanje luminiscencije SLO ($\lambda_{\max} = 580$ nm) i SLR ($\lambda_{\max} = 630$ nm).

Kako bi se utvrdili koeficijenti prijenosa kroz dugo prolazni filter od 600 nm, prvo se upotrebom pročišćenih enzima luciferaze SLO i SLR mjeri: i. intenzitet bioluminiscencije SLO i SLR bez filtra (F0), ii. intenzitet bioluminiscencije SLO i SLR koja je prošla kroz dugo prolazni filter od 600 nm (filter 1) te se iii. računaju koeficijenti prijenosa kroz dugo prolazni filter od 600 nm za SLO i SLR navedeni u nastavku.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	κO_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Ako se intenzitet SLO i SLR u ispitnom uzorku definiraju kao O i R: i. intenzitet svjetlosti bez filtra (potpuno optički) F0 i ii. intenzitet svjetlosti koja se emitira kroz dugo prolazni filter od 600 nm (filter 1) F1 opisuju se kako je prikazano u nastavku.

$$F0 = O + R$$

$$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

Te se formule mogu preoblikovati na sljedeći način:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Zatim se upotrebom izračunanih faktora propusnosti (κO_{R60} i κR_{R60}) te izmjerenih vrijednosti F0 i F1 mogu izračunati vrijednosti O i R na sljedeći način:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materijali i metode za utvrđivanje faktora propusnosti

1. Reagensi

Jedinstveni pročišćeni enzimi luciferaze:

liofilizirani pročišćeni enzim SLO;

liofilizirani pročišćeni enzim SLR;

(koji su za validacijsku studiju dobiveni od laboratorija GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan sa staničnom linijom THP-G8).

Reagens za test:

reagens za test luciferaze Tripluc® (na primjer od TOYOBO Cat#MRA-301).

Medij: za test luciferaze (30 ml, pohranjeno na temperaturi od 2 do 8 °C)

Reagens	Konc.	Konačna konc. u mediju	Potrebna količina
RPMI-1640	–	–	27 ml
FBS	–	10 %	3 ml

2. Priprema otopine enzima

Otopiti liofilizirani pročišćeni enzim luciferaze u epruveti dodavanjem 200 µl pufera Tris/HCl od 10 ~ 100 mM ili Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) obogaćenog s 10 % (w/v) glicerola, podijeliti otopinu enzima u alikvote od 10 µl u epruvetama za jednokratnu upotrebu od 1,5 ml i pohraniti ih u zamrzivač na temperaturi od – 80 °C. Zamrznuta otopina enzima može se upotrebljavati do najviše šest mjeseci. Pri upotrebi dodati 1 ml medija za test luciferaze (RPMI-1640 s 10 % FBS-a) u sve epruvete u kojima se nalaze otopine enzima (razrijeđena otopina enzima) i držati ih na ledu kako bi se spriječila deaktivacija.

3. Mjerenje bioluminiscencije

Odmrznuti reagens za test luciferaze Tripluc® (Tripluc) i držati ga na sobnoj temperaturi u vodenoj kupelji ili na sobnoj temperaturi. Uključiti luminometar 30 minuta prije početka mjerenja kako bi se omogućila stabilizacija fotomultiplikatora. Prenijeti 100 µl razrijeđene otopine enzima na crnu ploču s 96 jažica (s ravnim dnom) (referentni uzorak SLO u #B1, #B2, #B3, a referentni uzorak SLR u #D1, #D2, #D3). Zatim pipetom prenijeti 100 µl unaprijed zagrijanog Tripluca u svaku jažicu ploče koja sadržava razrijeđenu otopinu enzima. Ploču protresati deset minuta na sobnoj temperaturi (približno 25 °C) u jedinici za miješanje. Ako se u otopini u jažicama pojave mjehurići, treba ih ukloniti. Ploču staviti u luminometar kako bi se izmjerila aktivnost luciferaze. Bioluminiscencija se mjeri tri sekunde bez optičkog filtra (F0) i tri sekunde s optičkim filtrom (F1).

Koeficijent prijenosa optičkog filtra izračunan je na sljedeći način:

Koeficijent prijenosa (SLO (κO_{R60})) = (#B1 od F1 + #B2 od F1 + #B3 od F1) / (#B1 od F0 + #B2 od F0 + #B3 od F0)

Koeficijent prijenosa (SLR (κR_{R60})) = (#D1 od F1 + #D2 od F1 + #D3 od F1) / (#D1 od F0 + #D2 od F0 + #D3 od F0)

Izračunani faktori propusnosti upotrebljavaju se za sva mjerenja koja se obavljaju istim luminometrom.

Kontrola kvalitete opreme

Treba upotrebljavati postupke opisane u protokolu za IL-8 Luc (18.).

Dodatak 3.3.

TVARI ZA DOKAZIVANJE TEHNIČKE OSPOSOBLJENOSTI

Prije rutinske primjene ispitivanja opisanog u ovom Dodatku ispitnoj metodi B.71. laboratoriji bi trebali dokazati svoju tehničku osposobljenost tako što će za devet tvari preporučenih u tablici 1. dobiti očekivano predviđanje na temelju testa IL-8 Luc te za najmanje osam od devet tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti (izabrane tako da predstavljaju niz odgovora povezanih s opasnostima od izazivanja preosjetljivosti kože) dobiti vrijednosti koje su unutar odgovarajućeg referentnog raspona. Ostali kriteriji za odabir uključivali su to da je tvar komercijalno dostupna te da su dostupni visokokvalitetni *in vivo* referentni podaci i visokokvalitetni *in vitro* podaci dobiveni testom IL-8 Luc. Isto tako, za test IL-8 Luc dostupni su objavljeni referentni podaci (6. i 1.).

Tablica 1.:

Preporučene tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti za izvođenje testa IL-8 Luc

Tvari za dokazivanje tehničke osposobljenosti	CAS br.	Agre- gatno stanje	Topljivost u mediju X-VIVO15 pri 20 mg/ml	Predviđanje <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	Predviđanje testom IL-8 Luc ⁽²⁾	Referentni raspon (µg/ml) ⁽³⁾	
						CV ₀₅ ⁽⁴⁾	MIT u testu IL-8 Luc ⁽⁵⁾
2,4-dinitroklorbenzen	97-00-7	Kruta tvar	Netopljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (ekstremno jaka)	Pozitivno	2,3–3,9	0,5–2,3
Formaldehid	50-00-0	Teku- ćina	Topljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (jaka)	Pozitivno	9–30	4–9
2-merkaptobenzotia- zol	149-30-4	Kruta tvar	Netopljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	Pozitivno	250–290	60–250
Etilendiamin	107-15-3	Teku- ćina	Topljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (umjerena)	Pozitivno	500–700	0,1–0,4
Etilenglikol-dimetakri- lat	97-90-5	Teku- ćina	Netopljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (sla- ba)	Pozitivno	> 2000	0,04–0,1
4-alilanol (estragol)	140-67-0	Teku- ćina	Netopljivo	Tvar koja izaziva preosjetljivost (sla- ba)	Pozitivno	> 2 000	0,01–0,07
Streptomycin sulfat	3810-74-0	Kruta tvar	Topljivo	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	> 2 000	> 2 000
Glicerol	56-81-5	Teku- ćina	Topljivo	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	> 2 000	> 2 000
Izopropanol	67-63-0	Teku- ćina	Topljivo	Tvar koja ne izaziva preosjetljivost	Negativno	> 2 000	> 2 000

Kratice: CAS br. = registarski broj Službe za podatke o kemijskim tvarima

⁽¹⁾ Jakost *in vivo* utvrđena je prema kriterijima koje je predložio ECETOC (19.).

⁽²⁾ Na temelju vrijednosti uočenih u prijašnjim ispitivanjima (1. i 6.).

⁽³⁾ CV₀₅ i MIT u testu IL-8 Luc izračunani su upotrebom topljivosti u vodi koja je dobivena programom EPI Suite™.

⁽⁴⁾ CV₀₅: najmanja koncentracija pri kojoj kemikalije pokažu Inh-GAPLA manji od 0,05.

⁽⁵⁾ MIT: najniža koncentracija pri kojoj kemikalija ispunjava pozitivne kriterije.

Dodatak 3.4.

INDEKSI I KRITERIJI PROSUDBE

nIL8LA (nSLO-LA)

J-to ponavljanje ($j = 1 - 4$) i-te koncentracije ($i = 0 - 11$) mjeri se za IL8LA (SLO-LA) i GAPLA (SLR-LA). Normalizirana IL8LA, koja se naziva nIL8LA (nSLO-LA), definira se kao:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

To je osnovna mjerna jedinica u ovom testu.

Ind-IL8LA (FlnSLO-LA)

Multiplikacijski faktor povećanja uprosječne nIL8LA (nSLO-LA) za ponavljanje i-te koncentracije u usporedbi s vrijednošću pri koncentraciji od 0, Ind-IL8LA, primarna je mjera ovog testa. Taj se omjer bilježi sljedećom formulom:

$$\text{Ind-IL8LA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j} \right\}$$

Glavni laboratorij predložio je da vrijednost od 1,4 odgovara pozitivnom rezultatu za ispitanu kemikaliju. Ta se vrijednost temelji na istraživanju prijašnjih podataka glavnog laboratorija. Tim za upravljanje podacima zatim je upotrebljavao tu vrijednost u svim fazama validacijske studije. Primarni ishod, Ind-IL8LA, omjer je dvije aritmetičke sredine, kako je prikazano u jednadžbi.

Interval pouzdanosti od 95 % (95 % CI)

Interval pouzdanosti od 95 % (95 % CI) koji se temelji na omjeru može se procijeniti kako bi se pokazala preciznost te mjere primarnog ishoda. Donja granica intervala pouzdanosti od 95 % ≥ 1 ukazuje na to da je nIL8LA s i-tom koncentracijom značajno veća od vrijednosti u kontroli s otapalom. Interval pouzdanosti od 95 % može se izvesti na nekoliko načina. U ovoj je studiji upotrijebljena metoda poznata kao Fiellerov teorem. Taj se teorem intervala pouzdanosti od 95 % dobiva prema sljedećoj formuli:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

pri čemu je.

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$$

$$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2$$

$$n_{yi} = 4$$

$$\bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$$

$$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2$$

$t_{0.975(v)}$ je percentil od 97,5 centralne t-distribucije s vrijednošću v stupnja slobode, pri čemu je

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA je omjer uprosječene GAPLA (SLR-LA) za ponavljanje i -te koncentracije u usporedbi s vrijednošću za kontrolu s otapalom, a bilježi se kao:

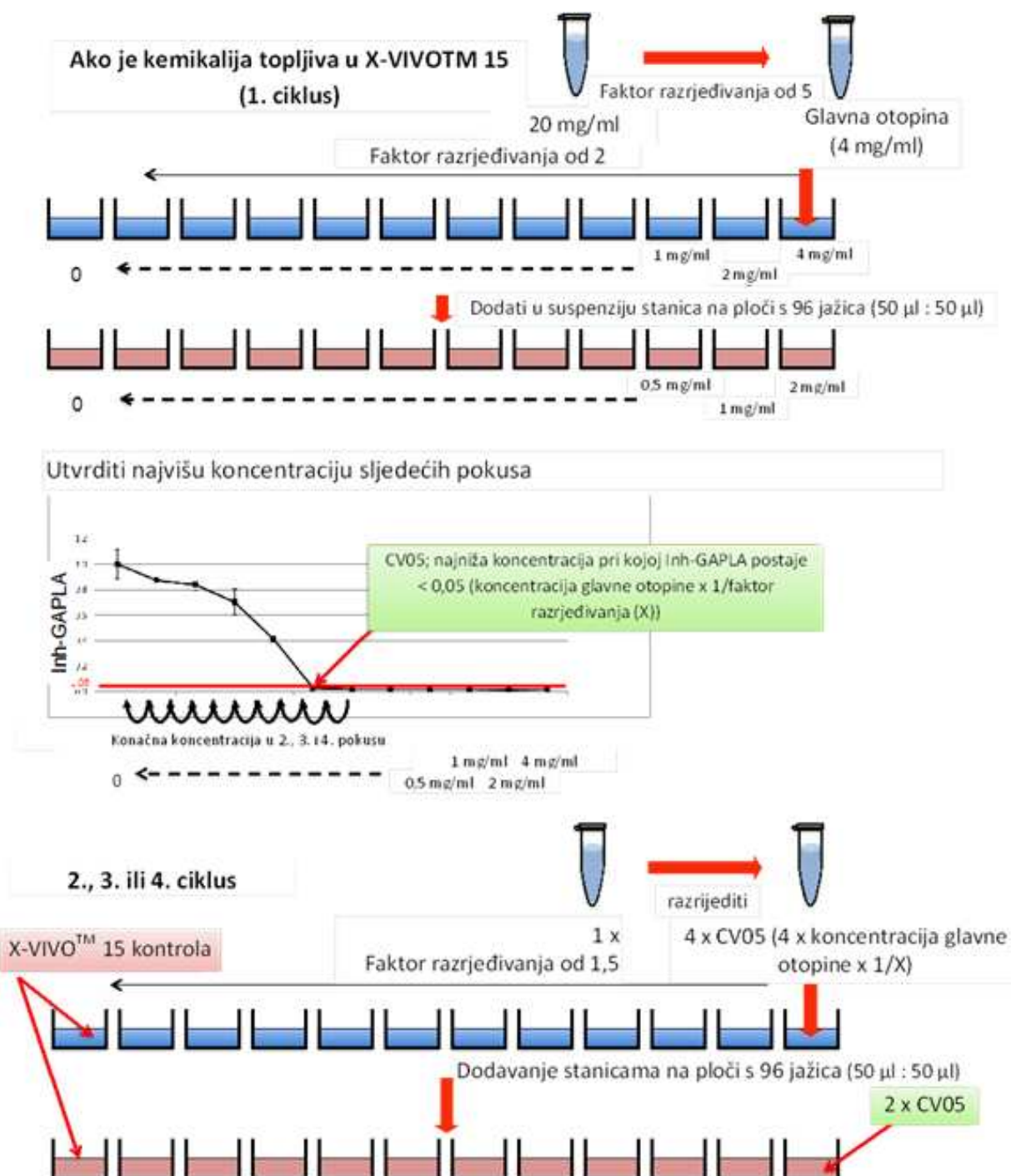
$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

Budući da je GAPLA nazivnik vrijednosti nIL8LA, iznimno male vrijednosti uzrokuju velike varijacije vrijednosti nIL8LA. Stoga se vrijednosti Ind-IL8LA s iznimno malom vrijednosti Inh-GAPLA (manja od 0,05) mogu smatrati slabom preciznošću.

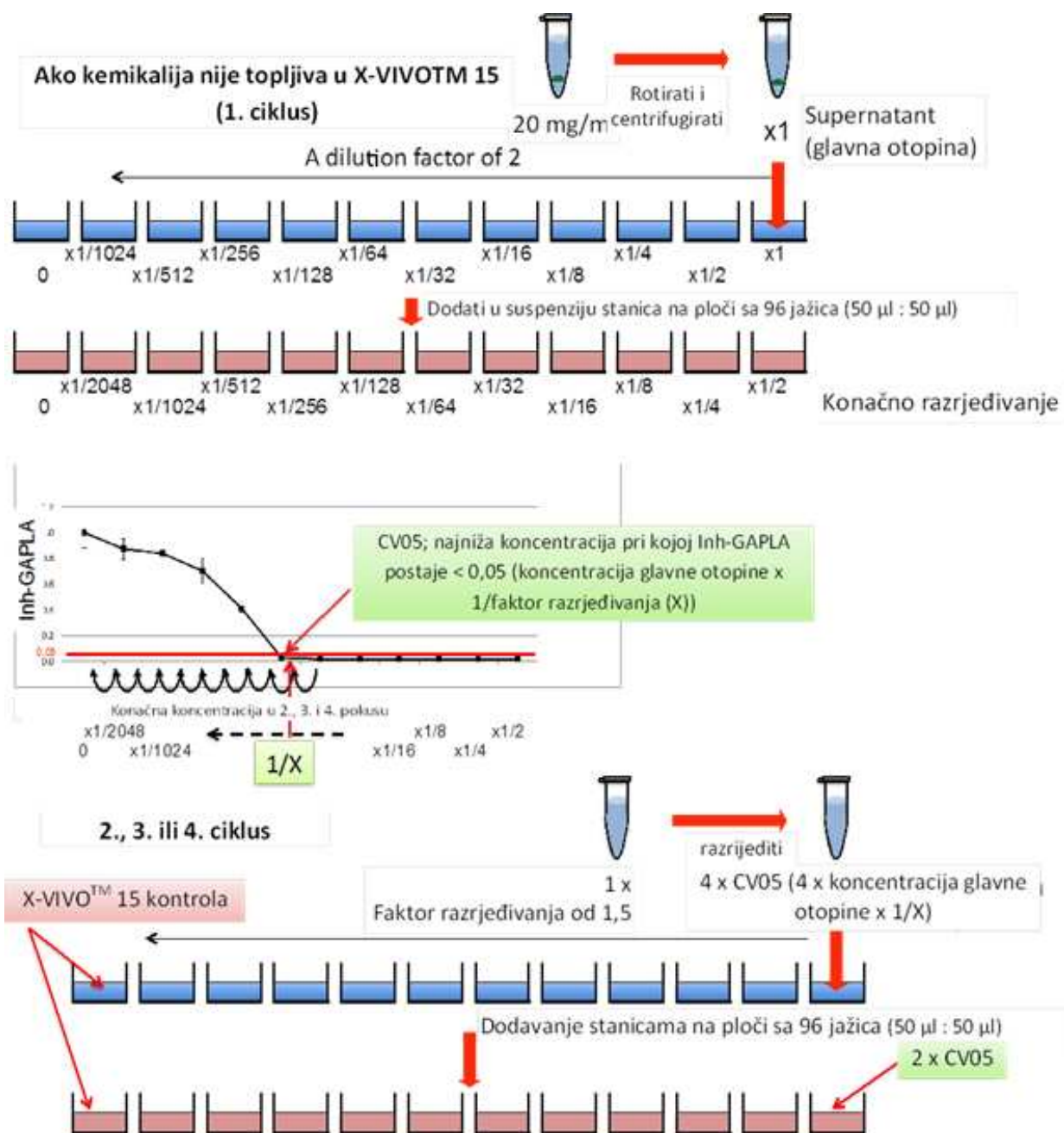
Dodatak 3.5.

PLAN METODA ZA OTAPANJE KEMIKA LIJA ZA TEST IL-8 LUC

(a) Za kemikalije koje se otapaju u mediju X-VIVO™ 15 pri 20 mg/ml



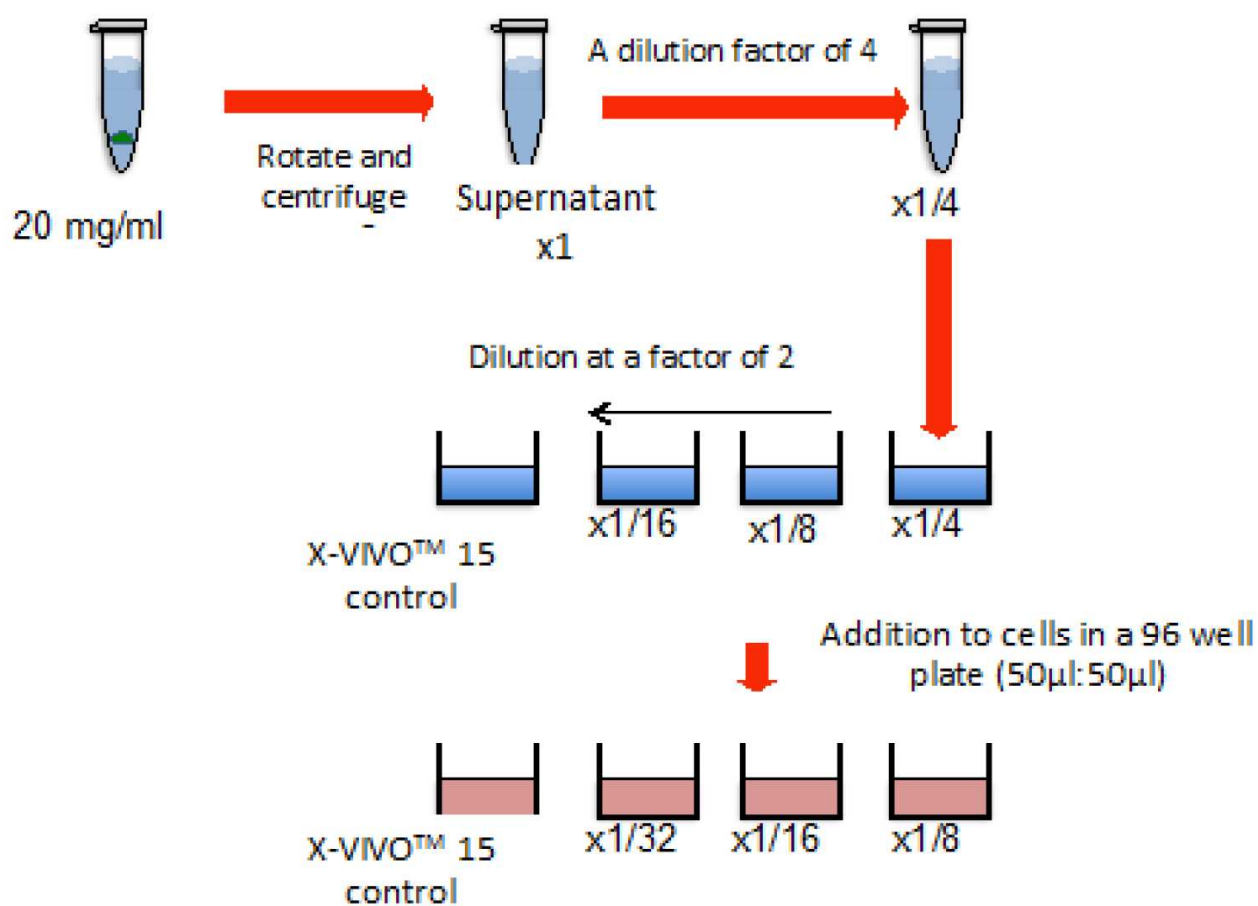
(b) Za kemikalije koje nisu topljive u mediju X-VIVOTM 15 pri 20 mg/ml



Dodatak 3.6.

PLAN METODE ZA OTAPANJE 4-NBB-A ZA POZITIVNU KONTROLU U TESTU IL-8 LUC;

The positive control : 4-NBB (insoluble in X-VIVO™ 15)



(9) u dijelu C dodaju se sljedeća poglavlja:

„C.52. ISPITIVANJE REPRODUKTIVNE TOKSIČNOSTI NA PRODULJENOJ GENERACIJI MEDAKE (MEOGRT)

UVOD

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 240 (2015.). U ispitivanju reproduktivne toksičnosti na produljenoj generaciji medake (MEOGRT, engl. *Medaka Extended One Generation Reproduction Test*) opisuje se sveobuhvatna ispitna metoda koja se temelji na ribama koje su izlagane tijekom više generacija kako bi se dobili podaci o ekološkoj opasnosti i procjeni rizika kemikalija, uključujući navodno endokrino disruptivne kemikalije (EDC). Izlaganje u ispitivanju MEOGRT nastavlja se do valjenja (do dva tjedna nakon oplodnje) u drugoj (F2) generaciji. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se obrazložila korisnost produljenja generacije F2 poslije točke valjenja; trenutačno ne postoji dovoljno informacija koje pružaju relevantne uvjete ili kriterije koji zahtijevaju produljenje generacije F2. Međutim, ova se ispitna metoda može ažurirati nakon što se razmotre nove informacije i podaci. Na primjer, smjernice o produljenju generacije F2 reprodukcijom potencijalno bi mogle biti korisne u određenim okolnostima (npr. kemikalije s velikim potencijalom biokoncentracije ili naznake transgeneracijskih učinaka kod drugih taksona). Ova ispitna metoda može se primjenjivati za procjenu potencijalnih kroničnih učinaka kemikalija, uključujući potencijalno endokrino disruptivne kemikalije, na ribe. U metodi se najveća važnost pridaje učincima koji su potencijalno relevantni za populaciju (točnije, štetnim učincima na preživljavanje, razvoj, rast i razmnožavanje) za izračun najviše koncentracije bez vidljivog učinka (NOEC) ili koncentracije s učinkom (ECx), iako treba napomenuti da su pristupi u kojima se upotrebljava ECx rijetko primjereni za velike studije ove vrste u kojima povećanje broja ispitnih koncentracija kako bi se omogućilo utvrđivanje željene vrijednosti ECx može biti nepraktično, a može dovesti i do znatne zabrinutosti za dobrobit životinja zbog velikog broja upotrijebljenih životinja. Za kemikalije za koje nije potrebna procjena u više generacija ili za kemikalije koje nisu potencijalno endokrino disruptivne kemikalije mogu biti primjerenije druge ispitne metode (1.). Japanska medaka primjerena je vrsta za upotrebu u ovoj ispitnoj metodi zbog njezina kratkog životnog vijeka i mogućnosti utvrđivanja genetskog spola (2.), što se smatra ključnom sastavnicom ove ispitne metode. Specifične metode i krajnje točke promatranja opisane u ovoj ispitnoj metodi primjenjive su samo na japansku medaku. Druge riblje vrste manje veličine (npr. zebrica) mogu se prilagoditi sličnom protokolu ispitivanja.
2. Ovom se ispitnom metodom mjeri nekoliko bioloških krajnjih točaka. Najveća važnost pridaje se potencijalnim štetnim učincima na parametre koji su relevantni za populaciju, uključujući preživljavanje, ukupni razvoj, rast i reprodukciju. Potom se, kako bi se pružile mehanističke informacije i poveznica s rezultatima iz drugih vrsta terenskih istraživanja i laboratorijskih studija ako postoje *a posteriori* dokazi da kemikalija potencijalno djeluje kao endokrini disruptor (npr. androgena ili estrogena aktivnost u drugim testovima i analizama), dobivaju druge korisne informacije mjerenjem mRNA za vitelogenin (*vtg*) (ili proteina vitelogenina, VTG), fenotipskih sekundarnih spolnih obilježja (SSC) koja se odnose na genetski spol te procjenom histopatologije. Treba napomenuti da, ako se ne sumnja u to da su ispitivana kemikalija ili njezini metaboliti endokrino disruptivne kemikalije, možda neće biti potrebno mjeriti te sekundarne krajnje točke te mogu biti primjerenije studije koje zahtijevaju manje resursa i manji broj životinja (1.). Definicije koje se upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

3. Zbog ograničenog broja ispitanih kemikalija i laboratorija uključenih u validaciju ovog poprilično složenog testa predviđa se da će se ispitna metoda revidirati i, prema potrebi, prilagoditi stečenom iskustvu kada za utvrđivanje učinka ovog novog dizajna studije bude dostupan dovoljan broj studija. Podaci se mogu upotrebljavati na petoj razini OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija (3.). Ispitna metoda započinje izlaganjem odraslih riba (generacija F0) ispitivanoj kemikaliji tijekom faze reprodukcije. Izlaganje se nastavlja tijekom razvoja i reprodukcije u generaciji F1 i valjenja u generaciji F2; stoga test omogućuje da se procijene i strukturni i aktivacijski endokrini putovi. Pri tumačenju krajnjih točaka povezanih s endokrinim sustavom može se primijeniti pristup snage dokaza.
4. U ispitivanju treba sudjelovati dovoljno jedinki kako bi se osigurala dovoljna snaga za procjenu krajnjih točaka relevantnih za reprodukciju (vidjeti Dodatak 3.), uz istovremeno osiguravanje upotrebe najmanjeg broja životinja potrebnog za ispitivanje radi dobrobiti životinja. Zbog velikog broja životinja koje se koriste važno je pažljivo razmotriti potrebu za provedbom ispitivanja u odnosu na postojeće podatke koji možda već sadržavaju relevantne informacije o brojnim krajnjim točkama u ispitivanju MEOGRT. OECD-ov okvir za ispitivanje toksičnosti za ribe može pružiti određene smjernice u tom pogledu (1.).

5. Ispitna metoda osmišljena je prvenstveno za razlikovanje učinaka jedne tvari. Međutim, ako je potrebno ispitivanje smjese, trebalo bi razmotriti hoće li se njime dobiti prihvatljivi rezultati za predviđenu regulatornu svrhu.
6. Prije započinjanja ispitivanja važno je imati informacije o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije, osobito kako bi se omogućilo dobivanje stabilnih otopina kemikalija. Važno je i imati dovoljno osjetljivu analitičku metodu za provjeru koncentracija ispitivane kemikalije.

NAČELO ISPITIVANJA

7. Ispitivanje započinje izlaganjem spolno zrelih mužjaka i ženki (najmanje 12 tjedana nakon oplodnje) u uzgojnim parovima u razdoblju od tri tjedna, tijekom kojih se ispitivana kemikalija distribuira u organizmu roditeljske generacije (F0) u skladu s njezinim toksikokinetičkim ponašanjem. Jajašca se prikupljaju što bliže prvom danu četvrtog tjedna kako bi se započela generacija F1. Tijekom uzgoja generacije F1 (ukupno 15 tjedana) procjenjuju se valjivost i preživljavanje. Osim toga ribe se uzorkuju 9–10 tjedana nakon oplodnje radi razvojnih krajnjih točaka i mriješćenje se procjenjuje tri tjedna, od 12. do 14. tjedna nakon oplodnje. Generacija F2 započinje se nakon trećeg tjedna procjene reprodukcije i uzgaja se do završetka valjenja.

KRITERIJI VALJANOSTI ISPITIVANJA

8. Primjenjuju se sljedeći kriteriji za valjanost ispitivanja:

- tijekom cijelog ispitivanja koncentracija otopljenog kisika trebala bi iznositi ≥ 60 % vrijednosti zasićenosti kisikom,
- tijekom cijelog trajanja studije srednja temperatura vode treba biti od 24 do 26 °C. Kratka odstupanja pojedinačnih akvarija od srednje vrijednosti ne bi trebala biti veća od 2 °C,
- srednja potencijalna plodnost kontrola u svakoj generaciji (F0 i F1) treba biti veća od 20 jajašaca po paru dnevno. Plodnost svih jajašaca koja nastanu tijekom procjene treba biti veća od 80 %. Osim toga, 16 parova od 24 preporučena kontrolna uzgojna para (> 65 %) treba proizvesti više od 20 jajašaca po paru dnevno,
- valjivost jajašaca u kontrolama treba biti ≥ 80 % (prosjek) (u svakoj od generacija F1 i F2),
- preživljavanje u kontrolama (F1) nakon valjenja do tri tjedna nakon oplodnje odnosno od tri tjedna nakon oplodnje do usmrćivanja za generaciju F1 (tj. 15 tjedana nakon oplodnje) treba biti ≥ 80 % (prosjek) odnosno ≥ 90 % (prosjek),
- trebali bi postojati dokazi da su se koncentracije ispitivane kemikalije u otopini uspješno održavale u rasponu od ± 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti.

Kad je riječ o temperaturi vode, iako to nije kriterij valjanosti, ponavljanja u okviru tretiranja ne bi se trebala međusobno statistički razlikovati i ispitne skupine u ispitivanju ne bi se trebale međusobno razlikovati (na temelju svakodnevnog mjerenja temperature i isključujući kratka odstupanja).

9. Iako se smanjena reprodukcija može uočiti u skupinama s većim izlaganjem, reprodukcija bi se trebala odvijati u dovoljnoj mjeri barem u trećoj najvišoj skupini i svim nižim skupinama generacije F0 kako bi se napunili inkubatori za valjenje. Nadalje, u trećoj najvišoj skupini i nižim skupinama izlaganja u generaciji F1 treba doći do primjerenog preživljavanja embrija kako bi se omogućila procjena krajnjih točaka na uzorcima riba koje nisu odrasle (vidjeti stavke 36. i 38. te Dodatak 9.). Osim toga, treba doći do barem minimalnog preživljavanja nakon valjenja (~ 20 %) u drugoj najvišoj skupini izlaganja generacije F1. To nisu kriteriji valjanosti sami po sebi, već preporuke kojima se omogućuje izračun pouzdanih vrijednosti NOEC.

10. Ako se uoči odstupanje od kriterija valjanosti ispitivanja, potrebno je razmotriti posljedice u odnosu na pouzdanost rezultata ispitivanja te ta odstupanja i razmatranja uključiti u izvješće o ispitivanju.

OPIS METODE

Oprema

11. Uobičajena laboratorijska oprema, posebno:

- (a) mjerači kisika i pH-vrijednosti;
- (b) oprema za utvrđivanje tvrdoće i lužnatosti vode;
- (c) odgovarajući uređaji za regulaciju temperature i po mogućnosti stalno praćenje;
- (d) akvariji izrađeni od kemijski inertnog materijala i odgovarajuće veličine s obzirom na preporučeno punjenje i gustoću nasada (vidjeti Dodatak 3.);
- (e) vaga prikladne točnosti (odnosno točnost u rasponu od $\pm 0,5$ mg).

Voda

12. Kao ispitna voda može se koristiti svaka voda koja je prikladna za preživljavanje i rast ispitne vrste u dovoljno dugom razdoblju. Ona treba biti stalne kakvoće tijekom razdoblja ispitivanja. Kako voda za razrjeđivanje ne bi neprimjereno utjecala na rezultat ispitivanja (npr. kompleksiranjem ispitivane kemikalije) ili imala negativan utjecaj na uspješnost uzgojnog jata, potrebno je u određenim razmacima uzimati uzorke na analizu. Mjerenja teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih aniona i kationa (npr. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pesticida, ukupnog organskog ugljika i suspendirane krute tvari treba provoditi npr. svakih šest mjeseci ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalne kakvoće. Neka kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje navedena su u Dodatku 2. pH vode treba biti u području od 6,5 do 8,5, ali tijekom jednog ispitivanja ne smije odstupati za više od $\pm 0,5$ pH jedinica.

Sustav izlaganja

13. Nisu utvrđeni dizajn i materijali koji se upotrebljavaju za sustav izlaganja. Za izgradnju ispitnog sustava koji nije kontaminiran tijekom prethodnih ispitivanja treba upotrebljavati staklo, nehrđajući čelik ili drugi kemijski inertan materijal. Za potrebe ovog ispitivanja primjeren sustav izlaganja može se sastojati od kontinuiranog protočnog sustava (4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12. i 13.).

Ispitne otopine

14. Glavnu otopinu ispitivane kemikalije treba uvesti u sustav izlaganja odgovarajućom crpkom. Brzinu protoka glavne otopine treba kalibrirati u skladu s analitičkom potvrdom ispitnih otopina prije početka izlaganja i tijekom ispitivanja periodično volumetrijski provjeravati. Ispitna otopina u svakoj komori primjereno se obnavlja (npr. najmanje pet obnavljanja volumena dnevno do 16 obnavljanja volumena dnevno ili do protoka od 20 ml/min), ovisno o stabilnosti ispitivane kemikalije i kvaliteti vode.

15. Ispitne otopine odabranih koncentracija pripremaju se razrjeđivanjem glavne otopine. Glavnu otopinu trebalo bi po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane kemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (npr. miješanjem i/ili tretiranjem ultrazvukom). Za postizanje odgovarajuće koncentracije glavne otopine mogu se upotrebljavati kolone/sustavi za zasićivanje ili pasivne metode doziranja (14.). Treba nastojati izbjeći otapala ili nosače jer: 1. određena otapala sama po sebi mogu dovesti do toksičnosti i/ili nepoželjnih ili neočekivanih odgovora; 2. ispitivanje kemikalija iznad njihove topljivosti u vodi (što se često javlja upotrebom otapala) može dovesti do pogrešnih utvrđivanja učinkovitih koncentracija; 3. upotreba otapala u dugoročnim ispitivanjima može dovesti do znatnog stupnja nastanka „biofilma” povezanog s djelovanjem mikroba, što može utjecati na okolišne uvjete te sposobnost održavanja koncentracija izlaganja i 4. ako ne postoje prijašnji podaci koji pokazuju da otapalo ne utječe na ishod studije, upotreba otapala zahtijeva tretiranje kontrola s otapalom, što ima posljedice u pogledu dobrobiti životinja jer su potrebne dodatne životinje za provedbu ispitivanja. Za kemikalije koje se teško ispituju, otapalo se može upotrebljavati kao krajnje sredstvo i potrebno je proučiti Smjernicu OECD-a 23 za ispitivanje toksičnosti teških tvari i smjesa u vodi (15.) kako bi se utvrdila najbolja metoda. Odabir otapala ovisit će o kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije i dostupnosti prijašnjih podataka o upotrebi otapala. Ako se upotrebljavaju otapala nosači, uz (negativne) kontrole bez otapala (samo voda za razrjeđivanje) treba procijeniti i primjerene kontrole s otapalom. Ako se ne može izbjeći upotreba otapala i dođe do djelovanja mikroba (nastanak biofilma), preporučuje se evidentiranje/izvješćivanje o nastanku biofilma po spremniku (najmanje jednom tjedno) tijekom cijelog ispitivanja. U idealnim uvjetima koncentraciju otapala u kontroli s otapalom i svim ispitnim obradama trebalo bi održavati stalnom. Ako se koncentracija otapala ne održava stalnom, najvišu koncentraciju otapala u ispitnoj obradi treba upotrijebiti u kontroli s otapalom. U slučajevima u kojima se upotrebljava otapalo nosač najviše koncentracije otapala ne bi smjele biti veće od 100 µl/l ili 100 mg/l (15.) i preporučuje se da se koncentracija otapala održava što nižom (npr. < 20 µl/l) kako bi se izbjegao mogući učinak otapala na krajnje točke koje se mjere (16.).

Ispitne životinje

Odabir i držanje riba

16. Ispitna je vrsta japanska medaka *Oryzias latipes* zbog njezina kratkog životnog vijeka i mogućnosti utvrđivanja genetskog spola. Iako se druge riblje vrste manje veličine mogu prilagoditi sličnom protokolu ispitivanja, specifične metode i krajnje točke promatranja opisane u ovoj ispitnoj metodi primjenjive su samo na japansku medaku (vidjeti stavak 1.). Medaka se lako uzgaja u zatočeništvu; postoje objavljene metode za njezinu kulturu (17., 18. i 19.) te su dostupni podaci iz kratkoročnih ispitivanja smrtonosnog djelovanja, ispitivanja u ranim životnim stadijima i ispitivanja cijelog životnog ciklusa (5., 6., 8., 9. i 20.). Sve se ribe drže u fotoperiodu od 16 sati svjetla i osam sati tame. Riba se hrane živim ličinkama račića *Artemia* spp. koje se po potrebi mogu dopuniti komercijalno dostupnom hranom u listićima. Komercijalno dostupnu hranu u listićima treba redovito analizirati radi kontaminirajućih tvari.
17. Ako se primjenjuje odgovarajuće gospodarenje životinjama, nije potreban specifičan protokol za uzgoj. Na primjer, medake se mogu uzgajati u spremnicima od dvije litre s 240 ličinki riba po spremniku do četiri tjedna nakon oplodnje, a zatim se mogu uzgajati u spremnicima od dvije litre s deset riba po spremniku do osam tjedna nakon oplodnje, kada se raspoređuju u uzgojne parove u spremnicima od dvije litre.

Aklimatizacija i odabir riba

18. Ispitne ribe treba odabrati iz iste laboratorijske zalihe koja je najmanje dva tjedna prije ispitivanja aklimatizirana u uvjetima kakvoće vode i osvjetljenja koji su slični ispitnim uvjetima (napomena: to razdoblje aklimatizacije nije razdoblje prije izlaganja *in situ*). Preporučuje se da se ispitne ribe dobiju iz interne kulture jer je prijevoz odraslih riba stresan i može ometati pouzdano mriješćenje. Riba treba hraniti ličinkama račića *Artemia* dvaput dnevno tijekom cijelog razdoblja držanja i tijekom faze izlaganja, koje se po potrebi dopunjuju komercijalno dostupnom hranom u listićima. Smatra se da su za početak ovog ispitivanja potrebna najmanje 42 uzgojna para (54 uzgojna para ako je potrebna kontrola s otapalom, djelomično zbog nedostatka prijašnjih podataka kojima se podupire upotreba samo kontrole bez otapala) kako bi se osigurala primjerena replikacija. Osim toga, treba provjeriti ima li svaki uzgojni par generacije F0 gene XX-XY (tj. uobičajeni par spolnih kromosoma za svaki spol) kako bi se spriječilo moguće uključivanje mužjaka kod kojih se spontano javljaju parovi XX (vidjeti stavak 39.).
19. Tijekom faze aklimatizacije treba evidentirati smrtnost riba u kulturi i primijeniti sljedeće kriterije nakon razdoblja prilagodbe od 48 sati:

— smrtnost iznad 10 % populacije kulture u sedam dana prije prijenosa u ispitni sustav: odbacuje se cijela šarža,

- smrtnost od 5 % do 10 % populacije u sedam dana prije prijenosa u ispitni sustav: aklimatizacija se nastavlja još sedam dana nakon razdoblja aklimatizacije od dva tjedna; ako je smrtnost tijekom drugih sedam dana veća od 5 %, odbacuje se cijela šarža,
 - smrtnost manja od 5 % populacije u sedam dana prije prijenosa u ispitni sustav: šarža se prihvaća.
20. Ribe se ne smiju liječiti u razdoblju aklimatizacije od dva tjedna prije ispitivanja ni tijekom razdoblja izlaganja te liječenje treba u potpunosti izbjegavati ako je moguće. Ribe s kliničkim znakovima bolesti ne treba koristiti u studiji. Treba voditi evidenciju opažanja i svih profilaktičkih i terapijskih liječenja tijekom razdoblja kulture koje prethodi ispitivanju.
21. Fazu izlaganja treba započeti spolno dimorfnom odraslom ribom, kojoj je genetski utvrđen spol, iz laboratorijske skupine reproduktivno zrelih životinja koje se uzgajaju na 25 ± 2 °C. Ribe treba identificirati kao dokazane rasplodne životinje (tj. dale su žive potomke) tijekom tjedna koji prethodi izlaganju. Pojedinačne mase riba po spolu u cijeloj skupini koja se koristi u ispitivanju trebale bi se na početku ispitivanja nalaziti u granicama od ± 20 % aritmetičke srednje mase istog spola. Prije ispitivanja treba izvagati poduzorak riba radi procjene srednje mase. Treba odabrati ribe starosti od najmanje 12 tjedana nakon oplodnje, mase ≥ 300 mg za ženke i ≥ 250 mg za mužjake.

PLAN ISPITIVANJA

Ispitne koncentracije

22. Preporučuje se upotreba pet koncentracija kemikalija i kontrole. Pri odabiru raspona ispitnih koncentracija treba razmotriti sve izvore informacija, uključujući kvantitativne odnose strukture i djelovanja (QSAR), primjenu analogije s analognim kemikalijama, rezultate ispitivanja riba kao što su analize akutne toksičnosti (poglavlje C.1. ovog Priloga), kratkoročni reproduksijski test na ribama (poglavlje C.48. ovog Priloga) i druge ispitne metode, npr. poglavlja C.15., C.37., C.41., C.47. i C.49. ovog Priloga (21., 22., 23., 24., 25. i 26.), ako su dostupni, ili, prema potrebi, ispitivanje za utvrđivanje raspona koje može uključivati fazu reprodukcije. Ako je potrebno, ispitivanje za utvrđivanje raspona može se provesti u uvjetima (kakvoća vode, ispitni sustav, prostor za određeni broj životinja) koji su slični onima koji se upotrebljavaju u konačnom ispitivanju. Ako se mora upotrijebiti otapalo, a nisu dostupni prijašnji podaci, može se upotrijebiti ispitivanje za utvrđivanje raspona kako bi se utvrdila prikladnost otapala. Najviša ispitna koncentracija ne smije biti viša od topljivosti u vodi, 10 mg/l ili 1/10 koncentracije LC50 u 96 h (27.). Najniža koncentracija trebala bi biti manja od najviše koncentracije za faktor od 10 do 100 puta. Upotrebom pet koncentracija u ovom ispitivanju ne omogućuje se samo mjerenje odnosa između doze i odgovora, već se dobiva i najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) i NOEC, koji su potrebni za procjenu rizika u nekim regulatornim programima ili nadležnostima. Interval između nominalnih koncentracija ispitivane kemikalije između susjednih razina tretiranja obično je $\leq 3,2$.

Ponavljanja unutar ispitnih skupina i kontrola

23. Treba upotrijebiti najmanje šest ispitnih komora s ponavljanjem po ispitnoj koncentraciji (vidjeti Dodatak 7.). Tijekom reproduktivne faze (osim kod generacije F0), replikacijska struktura udvostručuje se za procjenu potencijalne plodnosti i za svako ponavljanje koristi se samo jedan uzgojni par (vidjeti stavak 42.).
24. Uz ispitne koncentracije trebalo bi provesti kontrolu s vodom za razrjeđivanje i, prema potrebi, kontrolu s otapalom. Za kontrole treba upotrijebiti udvostručeni broj komora s ponavljanjem kako bi se osigurala primjerena statistička snaga (tj. za kontrole treba upotrebljavati najmanje 12 ponavljanja). Tijekom reproduktivne faze broj ponavljanja u kontrolama udvostručuje se (tj. najmanje 24 ponavljanja i u svakom je ponavljanju samo jedan uzgojni par koji će se pariti). Nakon reprodukcije kontrolna ponavljanja trebaju sadržavati najviše 20 embrija (riba).

POSTUPAK

Početak ispitivanja

25. Reprodukativno aktivne odrasle ribe koje se upotrebljavaju za započinjanje generacije F0 ispitivanja odabiru se na temelju dva kriterija: dobi (obično više od 12 tjedana nakon oplodnje, ali po mogućnosti ne više od 16 tjedana) i mase (treba biti ≥ 300 mg za ženke i ≥ 250 mg za mužjake).

26. Parovi ženki i mužjaka koji ispunjavaju prethodne specifikacije premještaju se kao pojedinačni parovi u svaki spremnik s ponavljanjem, tj. 12 ponavljanja u kontrolama i šest ponavljanja u tretiranjima kemikalijom na početku ispitivanja. Tim se spremnicima nasumično dodjeljuju oznake za tretiranje (npr. T1–T5 i kontrola) i ponavljanje (npr. A–L u kontrolama i A–F u tretiranjima) te se zatim stavljaju u sustav izlaganja s odgovarajućim protokolom u svaki spremnik.

Uvjeti izlaganja

27. Potpuni sažetak ispitnih parametara i uvjeta dostupan je u Dodatku 3. Poštovanje tih specifikacija treba dovesti do kontrolnih riba čije su vrijednosti krajnjih točaka slične onima navedenima u Dodatku 4.
28. Otopljeni kisik, pH i temperaturu treba mjeriti u barem jednoj ispitnoj posudi svake ispitne skupine i kontrole tijekom ispitivanja. Ta mjerenja, osim temperature, treba obavljati barem jednom tjedno tijekom cijelog razdoblja izlaganja. Srednja temperatura vode tijekom cijelog trajanja studije treba biti od 24 do 26 °C. Temperaturu treba mjeriti svakog dana tijekom cijelog razdoblja izlaganja. pH vode treba biti u području od 6,5 do 8,5, ali tijekom jednog ispitivanja ne smije odstupati za više od $\pm 0,5$ pH jedinica. Ponavljanja u tretiranju međusobno se ne bi trebala statistički razlikovati i ispitne skupine u ispitivanju ne bi se trebale međusobno razlikovati (na temelju svakodnevnog mjerenja temperature i isključujući kratka odstupanja).

Trajanje izlaganja

29. U ispitivanju se spolno zrele ribe iz generacije F0 izlažu u trajanju od tri tjedna. Četvrtog tjedna, približno na 24. ispitni dan, uspostavlja se generacija F1 i uzgojni parovi generacije F0 humano se usmrćuju te se evidentiraju njihova masa i duljina (vidjeti stavak 34.). Nakon toga slijedi izlaganje generacije F1 u trajanju od još 14 tjedana (ukupno 15 tjedana za F1) i generacije F2 tijekom dva tjedna do valjenja. Ukupno trajanje ispitivanja iznosi u prvom redu 19 tjedana (tj. do valjenja generacije F2). Vremenski okvir za ispitivanje prikazan je u tablici 2. i dodatno detaljno objašnjen u Dodatku 9.

Režim hranjenja

30. Ribe se mogu hraniti *ad libitum* račicama *Artemia* spp. (stari 24 sata, ličinke), koji se po potrebi mogu dopuniti komercijalno dostupnom hranom u listićima. Komercijalno dostupnu hranu u listićima treba redovito analizirati radi kontaminirajućih tvari, kao što su organoklorni pesticidi, policiklički aromatski ugljikovodici (PAH-i), poliklorirani bifenili (PCB-i). Treba izbjegavati hranu s povišenom razinom endokrinološki aktivnih tvari (tj. fitoestrogena) koje bi mogle dovesti u pitanje odgovor ispitivanja. Nepojeđenu hranu i izmet treba prema potrebi uklanjati iz ispitnih posuda, primjerice pažljivim čišćenjem dna svakog akvarija s pomoću sifona. Stranice i dno svakog akvarija isto treba čistiti jednom ili dvaput tjedno (npr. struganjem s pomoću lopatice). Primjer rasporeda hranjenja dostupan je u Dodatku 5. Količina hrane temelji se na broju riba po ponavljanju. Stoga se količina hrane smanjuje ako se u ponavljanju javi smrtnost.

Analitička utvrđivanja i mjerenja

31. Prije početka razdoblja izlaganja potrebno je osigurati pravilno funkcioniranje sustava dovoda kemikalije. Potrebno je utvrditi sve potrebne analitičke metode, uključujući dostatna saznanja o stabilnosti kemikalije u ispitnom sustavu. Koncentracije ispitivane kemikalije utvrđuju se u primjerenim razmacima tijekom ispitivanja, po mogućnosti barem svakog tjedna u jednom ponavljanju za svaku ispitnu skupinu, uz rotaciju ponavljanja iz iste ispitne skupine svakog tjedna.
32. Brzine protoka sredstva za razrjeđivanje i glavne otopine treba provjeravati u odgovarajućim razmacima tijekom ispitivanja (npr. najmanje tri puta tjedno). Preporučuje se da se rezultati temelje na izmjerenim koncentracijama. Međutim, ako je tijekom ispitivanja koncentracija ispitivane kemikalije u otopini uspješno održavana unutar 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti, tada se rezultati mogu temeljiti na nominalnim ili izmjerenim vrijednostima. U slučaju kemikalija koje se znatno akumuliraju u ribi, ispitne koncentracije mogu se smanjiti kako ribe rastu. U tim se slučajevima preporučuje da se prilagodi stopa obnavljanja ispitne otopine u svakoj komori kako bi se ispitne koncentracije održale što stabilnijima.

Opažanja i izmjerene krajnje točke

33. Krajnje točke koje se mjere uključuju potencijalnu plodnost, plodnost, valjenje, rast i preživljavanje radi procjene mogućih učinaka na razni populacije. Svakodnevno treba opažati i ponašanje te evidentirati svako neuobičajeno ponašanje. Ostale mehanističke krajnje točke uključuju imunotest za određivanje razine hepatičkog vtg mRNA ili proteina VTG (28.), spolne fenotipske markere kao što papile na podrepnoj peraji karakteristične za mužjake, histološku ocjenu gonadnog spola te histopatološku ocjenu bubrega, jetre i gonada (vidjeti popis krajnjih točaka u tablici 1.). Sve se te specifične krajnje točke ocjenjuju u kontekstu utvrđivanja genetskog spola jedinke, na temelju prisustva ili odsustva gena *dmy*, kojim se određuje muški spol medake (vidjeti stavak 41.). Uz to se ocjenjuje i vrijeme mriješćenja. Osim toga, mogu se izvesti jednostavni omjeri fenotipskog spola upotrebom informacija o broju papila na podrepnoj peraji kako bi se pojedinačne medake utvrdile kao fenotipski mužjaci ili ženke. Ne očekuje se da će se ovom ispitnom metodom utvrditi mala odstupanja od očekivanog omjera spolova jer relativno mali broj riba po ponavljanju neće osigurati dovoljnu statističku snagu. Isto tako, tijekom histopatološke ocjene procjenjuju se gonade i provode se znatno pouzdanije analize za procjenu gonadnog fenotipa u kontekstu genetskog spola.
34. Primarni je cilj ove ispitne metode ocijeniti učinke ispitivane kemikalije koji su potencijalno relevantni za populaciju. Mehanističke krajnje točke (VTG, SSC-i i određeni histopatološki učinci na gonade) isto mogu pomoći da se utvrdi posreduje li endokrina aktivnost nekim učincima. Međutim, na te mehanističke krajnje točke mogu utjecati i sustavne i druge toksičnosti. Stoga se mogu detaljno ocijeniti i histopatološki pregledi jetre i bubrega kako bi se pomoglo u boljem razumijevanju mogućih odgovora na mehanističkim krajnjim točkama. Međutim, ako se ne provode te detaljne ocjene, ipak treba evidentirati velike abnormalnosti koje su slučajno uočene tijekom histopatološke ocjene i treba izvijestiti o njima.

Humano usmrćivanje riba

35. Kod završetka izlaganja generacija F0 i F1 te kada se uzimaju poduzorci riba koje nisu odrasle, ribe treba eutanazirati odgovarajućim količinama otopine anestetika (npr. trikain-metansulfonat, MS-222 (CAS.886-86-2), 100–500 mg/l) puferiranim s 300 mg/l NaHCO₃ (natrijev bikarbonat, CAS.144-55-8) kako bi se smanjilo nadraživanje sluznice. Ako ribe pokazuju znakove znatne patnje (vrlo teška patnja i smrt mogu se pouzdano predvidjeti) te se smatra da su na umoru, životinje treba anestezirati i eutanazirati, a u analizi podataka te se ribe tretiraju kao smrtnost. Ako se riba eutanazira zbog morbiditeta, to treba evidentirati i o tome treba izvijestiti. Riba se može zadržati radi provedbe histopatološke analize ovisno o tome u kojoj se fazi studije eutanazira (fiksiranje ribe za moguću histopatološku analizu).

Rukovanje jajašcima i ličinkama riba

Prikupljanje jajašaca uzgojnih parova radi razmnožavanja sljedeće generacije

36. Jajašca se prikupljaju prvog dana (ili po potrebi prva dva dana) četvrtog ispitnog tjedna za prelazak s generacije F0 na generaciju F1 te 18. ispitnog tjedna za prelazak s generacije F1 na generaciju F2. Osamnaesti ispitni tjedan odgovara generaciji F1, odraslim ribama 15 tjedana nakon oplodnje. Važno je iz svakog spremnika ukloniti sva jajašca jedan dan prije početka prikupljanja jajašaca kako bi se osiguralo da su sva jajašca koja se prikupe od uzgojnog para iz istog mriješta. Nakon mriješćenja ženke medake ponekad nose svoja jajašca blizu otvora dok ih ne polože na supstrat. Ako u spremniku nema supstrata, jajašca mogu biti pričvršćena na ženku ili na dnu spremnika. Ovisno o tome gdje se nalaze, jajašca se oprezno uklanjaju sa ženke ili se s pomoću sifona uklanjaju s dna četvrtog ispitnog tjedna generacije F0 i 18. ispitnog tjedna generacije F1. Sva jajašca prikupljena u okviru tretiranja objedinjuju se prije distribucije u inkubacijske komore.
37. Treba ukloniti filamente jajašaca, koji drže jajašca mriješta na okupu. Oplodena jajašca (do 20) prikupljaju se od svakog uzgojnog para (jedan par po ponavljanju), objedinjuju se prema tretiranju i sustavno distribuiraju u primjerene inkubacijske komore (dodaci 6. i 7.). Upotrebom kvalitetnog disekcijskog mikroskopa mogu se uočiti znakovi rane oplodnje/razvoja kao što su stvaranje fertilizacijske membrane (korion), dioba stanica koja je u tijeku ili nastanak blastule. Komore inkubatora mogu se staviti u posebne „inkubacijske akvarije” koji se uspostavljaju za svako tretiranje (u tom se slučaju u njima moraju izmjeriti parametri kakvoće vode i koncentracije ispitivanih kemikalija) ili u akvarij s ponavljanjem u kojem će se držati izvaljene ličinke (npr. eleutero-embrij). Ako je potreban drugi dan prikupljanja (23. ispitni dan), sva jajašca iz oba dana treba objединiti i zatim sustavno raspodijeliti u svako od ponavljanja tretiranja.

Uzgoj jajašaca do valjenja

38. Oplođena jajašca kontinuirano se protresaju, npr. mjehurićima zraka u inkubatoru jajašaca ili vertikalnim njihanjem inkubatora jajašaca. Smrtnost oplođenih jajašaca (embrija) svakodnevno se provjerava i evidentira. Mrtva jajašca uklanjaju se iz inkubatora (Dodatak 9.). Sedmog dana nakon oplodnje protresanje se zaustavlja ili smanjuje kako bi se jajašca spustila na dno inkubatora. Time se potiče valjenje, do kojeg obično dolazi sljedećeg dana ili za dva dana. Mladunci (mlade ličinke; eleutero-embriji) broje se za svako tretiranje i kontrolu (osnova objedinjenih ponavljanja). Oplođena jajašca koja se ne izvale u razdoblju dvostruko duljem od srednjeg dana valjenja u kontroli (obično 16 ili 18 dana nakon oplodnje) smatraju se neodrživima te se odbacuju.
39. U svaki se spremnik s ponavljanjem premješta 12 mladunaca. Mladunci iz inkubacijskih komora objedinjuju se i sustavno distribuiraju u spremnike s ponavljanjem (Dodatak 7.). To se može obaviti nasumičnim odabirom mladunca iz skupine za tretiranje i uzastopnim dodavanjem mladunaca neselektivnim izvlačenjem u akvarij s ponavljanjem. Svaki spremnik treba sadržavati jednak broj ($n = 12$) izvaljenih ličinki (najviše 20 ličinki u svakom spremniku). Ako nema dovoljno mladunaca da bi se popunila sva ponavljanja tretiranja, preporučuje se da što više ponavljanja ima 12 mladunaca. Mladuncima se sigurno može rukovati s pomoću staklenih pipeta velikog promjera. Svi dodatni mladunci humano se usmrćuju anestetikom. Tijekom nekoliko tjedana prije uspostave uzgojnih parova treba evidentirati dan na koji se u svakom ponavljanju uoči prvo mriješćenje.

Uspostava uzgojnih parova*Obrezivanje peraja i utvrđivanje genotipskog spola*

40. Utvrđivanje genotipskog spola rezanjem peraja obavlja se od devetog do desetog tjedna nakon oplodnje (tj. od 12. do 13. ispitnog tjedna za generaciju F1). Sve ribe u spremniku anestetiziraju se (upotrebom odobrenih metoda, npr. IACUC) i uzima se mali uzorak s leđnog ili trbušnog vrha repne peraje svake ribe kako bi se utvrdio genotipski spol jedinke (29.). Ribe iz ponavljanja mogu se smjestiti u male kaveze (po mogućnosti jedna riba po kavezu) u spremniku s ponavljanjem. Umjesto toga, u kavezu se mogu držati dvije ribe ako ih se može razlikovati. Jedna je metoda da se pri uzimanju uzorka tkiva repna peraja različito odreže (npr. leđni ili trbušni vrh).
41. Genotipski spol medake utvrđuje se identificiranim i sekvenciranim genom (*dmy*) koji se nalazi na Y kromosomu. Prisustvo gena *dmy* ukazuje na jedinku XY bez obzira na fenotip, dok njegovo odsustvo ukazuje na jedinku XX bez obzira na fenotip (30.); (31.). Iz svakog uzorka peraje ekstrahira se deoksiribonukleinska kiselina (DNK), a prisustvo ili odsustvo gena *dmy* može se utvrditi metodama lančane reakcije polimerazom (PCR) (vidjeti Dodatak 9. u poglavlju C.41. ovog Priloga ili dodatke 3. i 4. u literaturi pod 29.).

Utvrđivanje uzgojnih parova

42. Informacije o genotipskom spolu upotrebljavaju se za utvrđivanje uzgojnih parova XX-XY neovisno o vanjskom fenotipu koji se može izmijeniti izlaganjem ispitivanoj kemikaliji. Na dan nakon utvrđivanja genotipskog spola svake ribe nasumično se odabiru dvije ribe XX i dvije ribe XY iz svakog ponavljanja i utvrđuju se dva uzgojna para XX-XY. Ako u ponavljanju ne postoje dvije ribe XX ili dvije ribe XY, primjerene ribe treba uzeti iz drugih ponavljanja u tretiranju. Prioritet je dobiti preporučeni broj ponavljanja uzgojnih parova (12) u svakom tretiranju i u kontrolama (24). Ribe s očiglednim abnormalnostima (problemi s plivaćim mjehurom, deformacije kralježnice, iznimne varijacije u veličini itd.) trebalo bi isključiti pri utvrđivanju uzgojnih parova. Tijekom reproduksijske faze za generaciju F1 svaki spremnik s ponavljanjem treba sadržavati samo jedan uzgojni par.

Uzorkovanje riba koje nisu odrasle i ocjena krajnjih točaka*Uzorkovanje riba koje nisu u uzgojnim parovima*

43. Nakon uspostave uzgojnih parova ribe koje nisu odabrane za daljnji uzgoj humano se usmrćuju radi mjerenja krajnjih točaka riba koje nisu odrasle u ispitnim tjednima od 12. do 13. (F1). Iznimno je važno da se s ribama postupa tako da se genotipski spol utvrđen za odabir uzgojnih parova i dalje može povezati s pojedinačnim ribama. Svi prikupljeni podaci analiziraju se u kontekstu genotipskog spola određene ribe. Svaka se riba upotrebljava za različita mjerenja krajnjih točaka, među ostalim: utvrđivanje stopa preživljavanja juvenilnih riba/riba koje nisu odrasle

(od sedmog do 12. ili 13. ispitnog tjedna (F1)), rast u duljinu (standardna duljina može se izmjeriti ako je repna peraja skraćena u svrhu uzorkovanja radi analize genetskog spola). Ukupna duljina može se izmjeriti ako se samo dio repne peraje, leđni ili trbušni, uzorkuje za *dmy* i tjelesnu masu (tj. mokra masa, osušeno upijajućim materijalom), *vtg* mRNA (ili VTG) iz jetre i papile na podrepnoj peraji (vidjeti tablice 1. i 2.). Napominje se da su mase i duljine uzgojnih parova potrebne i za izračun srednjeg rasta u ispitnoj skupini.

Uzorkovanje tkiva i mjerenje vitelogenina

44. Jetra se disecira i treba je spremati na temperaturu $\leq -70^{\circ}\text{C}$ do mjerenja *vtg* mRNA (ili VTG-a). Rep ribe, uključujući repnu peraju, čuva se u odgovarajućem fiksativu (npr. Davidsonov fiksativ) ili se fotografira tako da se papile na podrepnoj peraji mogu prebrojati u kasnijoj fazi. Po želji se istovremeno mogu uzorkovati i sačuvati i druga tkiva (npr. gonade). Koncentraciju VTG-a u jetri treba kvantificirati homolognom ELISA tehnikom (vidjeti preporučene postupke za medaku u Dodatku 6. u poglavlju C.48. ovog Priloga). Umjesto toga, Agencija SAD-a za zaštitu okoliša (U.S. EPA) utvrdila je metode za kvantifikaciju *vtg* mRNA, tj. ekstrakciju mRNA gena *vtg I* iz uzorka jetre i kvantifikaciju broja kopija gena *vtg I* (po nanogramu ukupnog mRNA) s pomoću kvantitativne metode lančane reakcije polimerazom (29.). Umjesto utvrđivanja broja kopija gena *vtg* u kontrolnim i ispitnim skupinama, može se upotrijebiti i metoda koja je ekonomičnija i tehnički manje zahtjevnja, odnosno utvrđivanje relativne promjene (omjer) u ekspresiji gena *vtg I* iz kontrolnih i ispitnih skupina.

Sekundarna spolna obilježja

45. U normalnim okolnostima samo spolno zreli mužjaci medake imaju papile, koje se razvijaju kao sekundarno spolno obilježje na kostima bodlje šipčice određenih podrepnih peraja, što čini potencijalni biomarker za endokrino disruptivne učinke. Metoda brojanja papila na podrepnoj peraji (broj kosti bodlje s papilama) nalazi se u Dodatku 8. Isto tako, broj papila na podrepnoj peraji po jedinki upotrebljava se za kategorizaciju te jedinke kao mužjaka ili ženke prema vanjskom fenotipu u svrhu izračuna jednostavnog omjera spolova po ponavljanju. Medaka s bilo kojim brojem većim od nule definira se kao mužjak; medaka bez papila na podrepnoj peraji definira se kao ženka.

Procjena potencijalne i stvarne plodnosti

46. Potencijalna i stvarna plodnost procjenjuju se od prvog do trećeg ispitnog tjedna kod generacije F0 te od 15. do 17. ispitnog tjedna kod generacije F1. Jajašca se prikupljaju svakodnevno od svakog uzgojnog para 21 uzastopan dan. Jajašca se svakog jutra nježno uklanjaju s ulovljenih ženki i/ili se s pomoću sifona uklanjaju s dna akvarija. I potencijalna i stvarna plodnost svakodnevno se evidentiraju za svaki uzgojni par ponavljanja. Potencijalna plodnost definira se kao broj izmriještenih jajašaca, a stvarna plodnost se funkcionalno definira kao broj oplodjenih i živih jajašaca u trenutku brojanja. Jajašca treba prebrojati što prije nakon prikupljanja.
47. Potencijalna plodnost ponavljanja svakodnevno se evidentira kao broj jajašaca po uzgojnom paru koji se analizira preporučenim statističkim postupcima upotrebom srednjih vrijednosti ponavljanja. Plodnost ponavljanja zbroj je plodnih jajašaca koje proizvede uzgojni par podijeljen zbrojem jajašaca koje proizvede taj uzgojni par. Statistički se plodnost analizira kao omjer po ponavljanju. Valjivost ponavljanja broj je mladunaca podijeljen brojem postavljenih embrija (obično 20). Statistički se valjivost analizira kao omjer po ponavljanju.

Uzorkovanje odraslih riba i ocjena krajnjih točaka

Uzorkovanje riba u uzgojnim parovima

48. Nakon 17. ispitnog tjedna (tj. nakon što uspješno započne generacija F2) odrasle ribe iz generacije F1 humano se usmrćuju i ocjenjuju se različite krajnje točke (vidjeti tablice 1. i 2.). Podrepna peraja slika se radi ocjene papila na podrepnoj peraji (vidjeti Dodatak 8.) i/ili se uklanja rep, neposredno ventralno od kloake, te se on fiksira za kasnije brojenje papila. Po želji se tada može uzorkovati i pohraniti dio repne peraje radi provjere genetskog spola (*dmy*). Po potrebi se može uzeti uzorak tkiva kako bi se ponovila analiza gena *dmy* radi potvrde genetskog spola određene ribe. Zatim se otvara trbušna šupljina kako bi se omogućila perfuzija odgovarajućim fiksativima (npr. Davidsonov fiksativ) prije uranjanja cijelog tijela u fiksativ. Međutim, ako se prije fiksiranja provodi odgovarajući korak permeabilizacije, ne treba se otvarati trbušna šupljina.

Histopatologija

49. Svaka se riba histološki ocjenjuje kako bi se utvrdila patologija u gonadnom tkivu (30.; 29.). Kako je navedeno u stavku 33., sustavne ili druge toksičnosti mogu utjecati na ostale mehanističke krajnje točke koje se ocjenjuju u ovoj analizi (tj. VTG, SSC-i i određeni histopatološki učinci na gonade). Stoga se mogu detaljno ocijeniti i histopatološki pregledi jetre i bubrega kako bi se pomoglo u boljem razumijevanju mogućih odgovora na mehanističkim krajnjim točkama. Međutim, ako se ne provode te detaljne ocjene, ipak treba evidentirati velike abnormalnosti koje su slučajno uočene tijekom histopatološke ocjene i treba izvijestiti o njima. Može se razmotriti „silazno očitavanje” od ispitne skupine s najvećim učinkom (u usporedbi s kontrolom) do tretiranja kod kojeg nema učinka, ali preporučuje se proučavanje smjernica za histopatologiju (29.). Uzorci se obično obrađuju/seciraju, nakon čega ih tumači patolog. Ako se upotrebljava pristup „silaznog očitavanja”, napominje se da se u postupku RSCABS (engl. *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices*) primjenjuje očekivanje da će se s povećanjem razina doza povećati i biološki učinak (patologija). Stoga će se izgubiti statistička snaga ako se promatra samo jedna visoka doza bez srednjih doza. Taj pristup može biti prihvatljiv ako nije potrebna statistička analiza kako bi se utvrdilo da visoka doza nema učinak. Iz te se ocjene izvodi i fenotip gonada.

Ostala opažanja

50. Ispitivanjem MEOGRT dobivaju se podaci koji se mogu upotrijebiti (npr. u pristupu snage dokaza) za istovremeno ocjenjivanje barem dvaju putova nastanka ishoda (AOP-i) koji završavaju narušavanjem reprodukcije: (a) putova kojima posreduje endokrini sustav koji uključuju disrupciju endokrine osi hipotalamus-hipofiza-gonade (HPG, engl. *hypothalamus-pituitary-gonadal endocrine axis*) i (b) putova koji uzrokuju smanjenje preživljavanja, rasta (dužina i masa) i reprodukcije putem toksičnosti kojom ne posreduje endokrini sustav. Krajnje točke koje se obično mjere u ispitivanjima kronične toksičnosti kao što su ispitivanje cijelog životnog ciklusa i ispitivanje u ranim životnim stadijima uključene su i u ovo ispitivanje i mogu se upotrebljavati za ocjenu opasnosti koju predstavljaju i načini djelovanja koji nisu posredovani endokrinim sustavom i putovi toksičnosti posredovani endokrinim sustavom. Tijekom ispitivanja svakodnevno treba opažati ponašanje i evidentirati svako neuobičajeno ponašanje. Osim toga, treba evidentirati smrtnost i izračunati preživljavanje do izdvajanja riba (šesti/sedmi ispitni tjedan), preživljavanje od izdvajanja do uzorkovanja riba koje nisu odrasle (od devetog do desetog tjedna nakon oplodnje) i preživljavanje od uspostave parova do uzorkovanja odraslih riba.

Tablica 1.

Pregled krajnjih točaka u ispitivanju MEOGRT (*)

Faza života	Krajnja točka	Generacija
Embrij (2 tjedna nakon oplodnje)	Valjenje (% i vrijeme potrebno za valjenje)	F1, F2
Juvenilna riba (4 tjedna nakon oplodnje)	Preživljavanje	F1
Riba koja nije odrasla (9 ili 10 tjedana nakon oplodnje)	Preživljavanje	F1
	Rast (dužina i masa)	
	Vitelogenin (mRNA ili protein)	
	Sekundarna spolna obilježja (papile na podrepnoj peraji)	
	Omjer spolova prema vanjskim obilježjima	
	Vrijeme do 1. mrijesta	
Odrasla riba (12–14 tjedana nakon oplodnje)	Razmnožavanje (potencijalna i stvarna plodnost)	F0, F1
Odrasla riba (15 tjedana nakon oplodnje)	Preživljavanje	F1
	Rast (dužina i masa)	
	Sekundarna spolna obilježja (papile na podrepnoj peraji)	
	Histopatologija (gonada, jetra, bubreg)	

(*) Ove krajnje točke treba statistički analizirati.

VREMENSKI OKVIR

51. Vremenski okvir za ispitivanje MEOGRT prikazan u tablici 2. prikazuje ispitivanje. Ispitivanje MEOGRT uključuje četiri tjedna izlaganja odraslih riba generacije F0 i 15 tjedana izlaganja generacije F1 te razdoblje izlaganja za drugu generaciju (F2), do valjenja (dva tjedna nakon oplodnje). Aktivnosti tijekom ispitivanja MEOGRT sažete su u Dodatku 9.

Tablica 2.

Izlaganje i vremenski okvir za mjerenje krajnjih točaka u ispitivanju MEOGRT

Izlaganje i vremenski okvir krajnjih točaka u ispitivanju MEOGRT																				
F0	1.	2.	3.	4.																
F1				1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.		
F2																	1.	2.		
Ispitni tjedan	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	
Oznaka životne faze					Embrij				Ličinke				Juvenilna riba				Riba koja nije odrasla		Odrasla riba	
Krajnje točke																				
Potencijalna plodnost	F ₀														F ₁					
Plodnost	F ₀														F ₁					
Valjenje					F ₁														F ₂	
Preživljavanje					F ₁						F ₁							F ₁		
Rast					F ₀								F ₁						F ₁	
Vitelogenin												F ₁								
Sekundarni spol												F ₁						F ₁		
Histopatologija																		F ₁		
Ispitni tjedan	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	
• Plan izvođenja pokusa ima sedam skupina ponavljanja - pet za tretiranja ispitivanom kemikalijom - dva za kontrolna tretiranja (četiri ako se upotrebljava otapalo) • Plan unutar skupine 12 ponavljanja za reprodukciju, patologiju odraslih riba i SSC (od desetog do 18. tjedna) - šest ponavljanja za valjenje, preživljavanje, Vtg te SSC i rast riba koje nisu odrasle (od prvog do devetog tjedna) SSC: sekundarna spolna obilježja; t.: tjedni; Vtg: vitelogenin																				

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Statistička analiza

52. Budući da se genotipski spol utvrđuje za sve ispitne ribe, podatke treba analizirati posebno za svaki genotipski spol (tj. mužjaci XY i ženke XX). Ako se to ne učini, znatno će se smanjiti statistička snaga bilo kakve analize. Statističke analize podataka trebale bi po mogućnosti poštovati postupke opisane u OECD-ovu dokumentu Sadašnji pristupi u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti: Smjernice za primjenu (32.). Dodatne smjernice za statističku analizu navedene su u Dodatku 10.
53. Plan ispitivanja i odabir statističkog testa trebaju omogućiti odgovarajuću snagu za otkrivanje promjena od biološke važnosti na krajnjim točkama na kojima se izvješćuje o NOEC-u (32.). Izvješćivanje o koncentracijama s relevantnim učinkom i parametrima može ovisiti o zakonodavnom okviru. Treba utvrditi postotak promjene na svakoj krajnjoj točki koju je važno otkriti ili procijeniti. Plan ispitivanja trebao bi biti osmišljen tako da se to omogući. Nije vjerojatno da će se isti postotak promjene odnositi na sve krajnje točke ni da će se moći osmisлити izvediv pokus koji bi zadovoljio te kriterije za sve krajnje točke i stoga je važno usredotočiti se na krajnje točke koje su bitne za pokus pri odgovarajućem planiranju pokusa. U Dodatku 10. dostupni su statistički dijagram toka i smjernice koji mogu pomoći u obradi podataka i odabiru najprimjerenijeg statističkog testa ili modela za upotrebu. Mogu se primjenjivati i drugi statistički pristupi uz uvjet da su znanstveno opravdani.

54. Bit će potrebna analiza varijacija u svakom skupu ponovljenih uzoraka primjenom analize varijance ili tablica kontingencije te primjena odgovarajućih metoda statističke analize na temelju te analize. Za višestruku usporedbu rezultata pojedinačnih koncentracija i kontrola preporučuje se postupak postupnog snižavanja za kontinuirane odgovore (npr. Jonckheere-Terpstraov test). Ako podaci nisu u skladu s monotoničnim odgovorom na koncentraciju, treba upotrijebiti Dunnettov ili Dunnov test (po potrebi nakon primjerene transformacije podataka).
55. Za potencijalnu plodnost jajašca se broje svakodnevno, ali se mogu analizirati kao ukupan broj jajašaca ili kao ponovljeno mjerenje. U Dodatku 10. navode se pojedinosti o načinu analiziranja te krajnje točke. Za histopatološke podatke u obliku ocjene ozbiljnosti razvijen je novi statistički test – RSCABS (engl. Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) (33.).
56. Treba izvijestiti o svim krajnjim točkama uočenima u tretiranjima kemikalijom koja su znatno različita od odgovarajućih kontrola.

Razmatranja o analizi podataka

Upotreba kompromitirajućih razina obrade

57. Nekoliko čimbenika uzima se u obzir kako bi se utvrdilo pokazuje li ponavljanje ili cjelokupna obrada očitu toksičnost i je li potrebno ukloniti ih iz analize. Očita toksičnost definira se kao više od četiri smrtna slučaja u bilo kojem ponavljanju od trećeg do devetog tjedna nakon oplodnje koji se ne mogu objasniti tehničkom pogreškom. Ostali znakovi očite toksičnosti uključuju krvarenje, neobična ponašanja, neuobičajene načine plivanja, anoreksiju i bilo koje druge kliničke znakove bolesti. Za subletalne znakove toksičnosti mogu biti potrebne kvalitativne procjene i uvijek ih je potrebno obaviti u odnosu na kontrolnu skupinu s vodom za razrjeđivanje (samo čista voda). Ako je kod tretiranja s najvišim koncentracijama prisutna očita toksičnost, preporučuje se da se ta tretiranja isključe iz analize.

Kontrole s otapalom

58. Uporabu otapala potrebno je uzeti u obzir samo kao krajnje sredstvo, kada se razmotre sve druge opcije prijenosa kemikalije. Ako se upotrebljava otapalo, tada je potrebno paralelno provesti kontrolu s vodom za razrjeđivanje. Na kraju ispitivanja treba procijeniti moguće učinke otapala. To se radi statističkom usporedbom kontrolne skupine s otapalom i kontrolne skupine s vodom za razrjeđivanje. Najrelevantnije krajnje točke koje treba razmotriti u toj analizi determinante su rasta (masa) jer na njih mogu utjecati opće toksičnosti. Ako se na tim krajnjim točkama otkriju znatne razlike između kontrolnih skupina s vodom za razrjeđivanje i s otapalom, treba primijeniti stručnu prosudbu kako bi se utvrdilo je li narušena valjanost ispitivanja. Ako se dvije kontrole razlikuju, tretiranja izložena kemikaliji treba usporediti s kontrolom s otapalom osim ako je poznato da se prednost daje kontroli s vodom za razrjeđivanje. Ako nema statistički značajne razlike između dviju kontrolnih skupina, preporučuje se da se tretiranja izložena ispitivanoj kemikaliji usporede s objedinjenim kontrolama (kontrolne skupine s otapalom i s vodom za razrjeđivanje), osim ako je poznato da se prednost daje samo kontrolnoj skupini s vodom za razrjeđivanje ili s otapalom.

Izvješće o ispitivanju

59. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija: fizikalno stanje i po potrebi fizikalno-kemijska svojstva,

— podaci za identifikaciju kemikalije.

Tvar s jednim sastojkom:

— fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

— kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd. (uključujući udio organskog ugljika, prema potrebi).

Tvar s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

- opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Ispitne vrste:

- znanstveni naziv, soj ako je dostupno, podrijetlo, metoda sakupljanja oplođenih jajašaca i kasnije postupanje.

Ispitni uvjeti:

- fotoperiodi,
- plan ispitivanja (npr. veličina komore, materijal i volumen vode, broj ispitnih komora i ponavljanja, broj mladunaca po ponavljanju),
- način pripreme glavnih otopina i učestalost obnavljanja (ako se koristi sredstvo za otapanje, trebalo bi ga navesti zajedno s koncentracijom),
- metoda doziranja ispitivane kemikalije (npr. crpkama, sustavima za razrjeđivanje),
- iskoristivost metode i nazivnih ispitnih koncentracija, granica kvantifikacije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije u ispitnim posudama te metoda kojom su one dobivene i dokazi da se izmjerene vrijednosti odnose na koncentracije ispitivane kemikalije u stvarnoj otopini,
- svojstva vode za razrjeđivanje: pH, tvrdoća, temperatura, koncentracija otopljenog kisika, rezidualni klor (ako se mjeri), ukupni organski ugljik (ako se mjeri), suspendirana kruta tvar (ako se mjeri), salinitet ispitnog medija (ako se mjeri) i ostala provedena mjerenja,
- nazivne ispitne koncentracije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije,
- kakvoća vode u ispitnim posudama, pH, temperatura (dnevno) i koncentracija otopljenog kisika,
- detaljne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, izvor, količina hrane i učestalost hranjenja).

Rezultati:

- dokazi o usklađenosti kontrola s općim validacijskim kriterijima,
- sljedeći podaci za kontrolu (i kontrolu s otapalom ako se koristi) i ispitne skupine: valjenje (valjivost i vrijeme potrebno za valjenje) za generacije F1 i F2, preživljavanje nakon valjenja za F1, rast (dužina i tjelesna masa) za F1, genotipski spol i spolna diferencijacija (npr. sekundarna spolna obilježja na temelju papila na podrepronoj peraji i gonadna histologija) za F1, fenotipski spol za F1, sekundarna spolna obilježja (papile na podrepronoj peraji) za F1, vtg mRNA (ili protein VTG) za F1, histopatološka ocjena (gonade, jetra i bubreg) za F1 i reprodukcija (potencijalna i stvarna plodnost) za F0, F1 (vidjeti tablice 1. i 2.),
- pristup za statističku analizu (regresijska analiza ili analiza varijance) i obrada podataka (primijenjeni statistički testovi ili modeli),
- najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) za svaki ocijenjeni odgovor,

- najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) za svaki ocijenjeni odgovor (pri $p = 0,05$); EC_x za svaki ocijenjeni odgovor, ako je primjenjivo, te intervali pouzdanosti (npr. 90 % ili 95 %) i graf prilagođenog modela primijenjenog za izračun vrijednosti EC_x , nagib krivulje koncentracija – odgovor, formula regresijskog modela, procijenjeni parametri modela i njihove standardne pogreške,
- sva odstupanja od ove ispitne metode i odstupanja od kriterija prihvatljivosti te razmatranja potencijalnih posljedica na ishod ispitivanja.

60. Za rezultate mjerenja krajnjih točaka treba prikazati srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije (ako je moguće, i na temelju ponavljanja i koncentracija).

LITERATURA

1. OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
2. Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1.–36.
3. OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
4. Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457.–464.
5. Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925.–1930.
6. Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552.–2560.
7. Kang JJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71.–80.
8. Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692.–1698.
9. Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487.–1496.
10. Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288.–295.
11. Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78.–86.

12. Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11.–23.
13. U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Dostupno na: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
14. Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593.–599.
15. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
16. Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Review. Aquatic Toxicology* 76: 69.–92.
17. Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
18. Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287.–1293.
19. Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley-Blackwell.
20. Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330.–338.
21. Poglavlje C.15. ovog Priloga, Test kratkotrajne toksičnosti na ribama u stadiju embrija i mlađi sa žumanjčanom vrećicom.
22. Poglavlje C.37. ovog Priloga, 21-dnevni test na ribama: kratkoročni test probira na estrogensku i androgensku aktivnost i inhibiciju aromataze.
23. Poglavlje C.41. ovog Priloga, Ispitivanje spolnog razvoja riba.
24. Poglavlje C.48. ovog Priloga, Kratkoročni reproduksijski test na ribama.
25. Poglavlje C.47. ovog Priloga, Ispitivanje toksičnosti na ribama u ranim životnim stadijima.

26. Poglavlje C.49. ovog Priloga, Ispitivanje akutne toksičnosti na ribljim embrijima.
27. Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067.–1076.
28. Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301.–308.
29. OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
30. Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Scharl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245.–251.
31. Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613.–619.
32. OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (prilozi ovoj publikaciji postoje kao zasebni dokument), OECD Publishing, Pariz.
33. Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108.–1116.

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Kemikalija: tvar ili smjesa.

ELISA: imunoenzimski test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Potencijalna plodnost = broj jajašaca.

Stvarna plodnost = broj živih jajašaca/potencijalna plodnost.

Vilična dužina (FL) odnosi se na dužinu od vrha usta do kraja srednjih šipčica repne peraje i primjenjuje se na ribe kod kojih je teško odrediti gdje završava kralježnica (www.fishbase.org).

Valjivost = mladunci/broj embrija kojima se inkubator napuni.

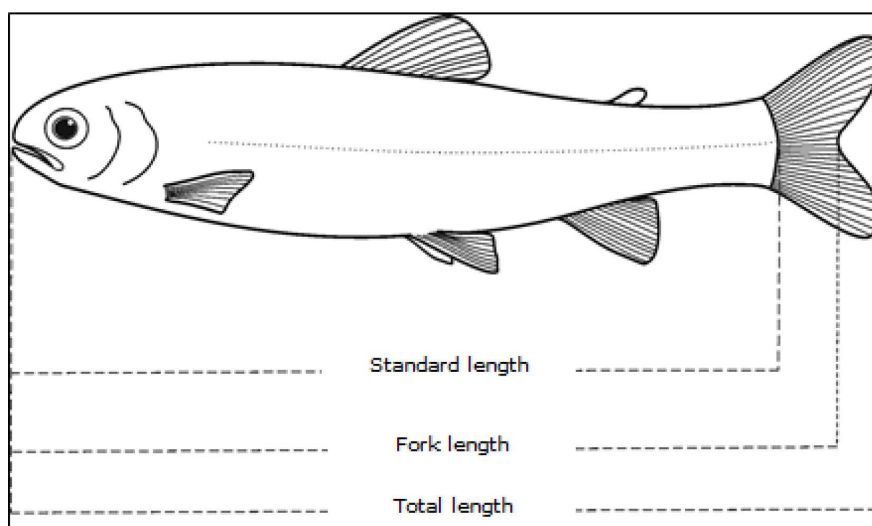
IACUC: institucionalni odbor za dobrobit i upotrebu životinja (engl. *Institutional Animal Care and Use Committee*).

Standardna dužina (SL) odnosi se na dužinu ribe izmjerenu od vrha usta do stražnjeg kraja zadnjeg kralješka ili do stražnjeg kraja srednjeg bočnog dijela hipuralne ploče. Jednostavnije rečeno, pri mjerenju se isključuje dužina repne peraje (www.fishbase.org).

Ukupna dužina (TL) odnosi se na dužinu od vrha usta do vrha dužeg reznja repne peraje, obično mjereno na reznjevima stisnutima duž središnje linije. Mjeri se u ravnoj liniji, a ne uz krivulju tijela (www.fishbase.org).

Slika 1.

opis različitih dužina koje se primjenjuju.



ECx: (koncentracija s x-postotnim učinkom) koncentracija je koja u određenom razdoblju izlaganja izaziva x-postotni učinak na ispitne organizme u usporedbi s kontrolom. Na primjer, EC50 je koncentracija za koju se procjenjuje da stvara učinak na krajnju točku ispitivanja u 50 % izložene populacije tijekom određenog razdoblja izlaganja.

Protočno ispitivanje je ispitivanje sa stalnim protokom ispitne otopine kroz ispitni sustav za vrijeme izlaganja.

Os HPG: os hipotalamus-hipofiza-gonade.

IUPAC: Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju.

Masa riba u odnosu na prostor: mokra masa ribe po volumenu vode.

Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) najniža je ispitana koncentracija ispitivane kemikalije kod koje je uočen statistički značajan učinak kemikalije (pri $p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom. Međutim, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a trebale bi imati jednak ili veći štetan učinak od onoga koji je uočen pri LOEC-u. Ako se ne mogu ispuniti ta dva uvjeta, trebalo bi navesti posebno objašnjenje za odabir LOEC-a (a time i NOEC-a). Smjernice se nalaze u dodacima 5. i 6.

Medijan smrtonosne koncentracije (LC50): koncentracija ispitivane kemikalije koja je procijenjena kao smrtonosna za 50 % ispitnih organizama za vrijeme ispitivanja.

Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) ispitna je koncentracija neposredno ispod LOEC-a koja unutar navedenog razdoblja izlaganja nema statistički značajan učinak ($p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom.

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification.*

Broj riba u odnosu na prostor: broj riba po volumenu vode.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi ili biološki materijali.

VTG: vitelogenin je fosfolipoglikoproteinski prekursor proteina žumanjka koji je u pravilu prisutan u spolno aktivnih ženki svih vrsta koje liježu jaja.

WPF: tjedana nakon oplodnje.

Dodatak 2.

NEKA KEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZRJEĐIVANJE

Tvar	Granična koncentracija
Lebdeće čestice	5 mg/l
Ukupni organski ugljik	2 mg/l
Neionizirani amonijak	1 µg/l
Rezidualni klor	10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
Ukupni organoklorni pesticidi plus poliklorirani bifenili	50 ng/l
Ukupni organski klor	25 ng/l
Aluminij	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Krom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Bakar	1 µg/l
Željezo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikal	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmij	100 ng/l
Živa	100 ng/l
Srebro	100 ng/l

Dodatak 3.

ISPITNI UVJETI ZA MEOGRT

- | | |
|--|---|
| 1. Preporučena vrsta | Japanska medaka (<i>Oryzias latipes</i>) |
| 2. Vrsta ispitivanja | Kontinuirano protočno |
| 3. Temperatura vode | Nominalna ispitna temperatura iznosi 25 °C. Srednja temperatura tijekom cijelog ispitivanja u svakom spremniku iznosi od 24 do 26 °C. |
| 4. Kvaliteta osvjetljenja | Fluorescentne žarulje (široki spektar i ~ 150 lumena/m ²) (~ 150 lx). |
| 5. Fotoperiod | 16 sati svjetla, osam sati tame |
| 6. Masa riba u odnosu na prostor | F0: dvije odrasle ribe po ponavljanju; F1: počinje se s najviše 20 jajašaca (embrija) po ponavljanju, smanjuje se na 12 embrija po ponavljanju pri valjenju i zatim dvije odrasle ribe (uzgojni par XX-XY) od devetog do desetog tjedna nakon oplodnje za reproduksijsku fazu |
| 7. Najmanji iskoristivi volumen ispitne komore | 1,8 l (npr. ispitna komora veličine: 18 x 9 x 15 cm) |
| 8. Izmjene volumena ispitnih otopina | Najmanje pet obnavljanja volumena dnevno do najviše 16 obnavljanja volumena dnevno (ili protok od 20 ml/min) |
| 9. Starost ispitnih organizama na početku | F0: > 12 tjedana nakon oplodnje, ali ne preporučuje se više od 16 tjedana nakon oplodnje |
| 10. Broj organizama po ponavljanju | F0: dvije ribe (par mužjaka i ženke); F1: najviše 20 riba (jajašaca) po ponavljanju (nastalih iz uzgojnih parova generacija F0 i F1). |
| 11. Broj tretiranja | Pet tretiranja ispitivanom kemikalijom i odgovarajuće kontrole |
| 12. Broj ponavljanja po tretiranju | Najmanje šest ponavljanja po tretiranju za ispitivanu kemikaliju i najmanje 12 ponavljanja za kontrolu i za kontrolu s otapalom, ako se upotrebljava (broj ponavljanja udvostručuje se u reproduksijskoj fazi generacije F1) |
| 13. Broj organizama po ispitivanju | Najmanje 84 ribe u generaciji F0 i 504 u generaciji F1 (ako se koristi kontrola s otapalom, 108 riba u generaciji F0 i 648 riba u generaciji F1). Jedinica koja se broji jest posteleutero-embrij. |
| 14. Režim hranjenja | Ribe se hrane <i>ad libitum</i> račićima <i>Artemia</i> spp. (ličinke stare 24 sata), koji se po potrebi mogu dopuniti komercijalno dostupnom hranom u listićima (primjer režima hranjenja kojim se osiguravaju odgovarajući rast i razvoj kojim se podupire pouzdana reprodukcija nalazi se u Dodatku 5.). |
| 15. Dozračivanje | Bez dozračivanja, osim ako se koncentracija otopljenog kisika približi vrijednosti < 60 % vrijednosti zasićenosti kisikom |
| 16. Voda za razrjeđivanje | Čista površinska, izvorska ili rekonstituirana voda ili voda iz slavine iz koje je uklonjen klor. |

17. Razdoblje izlaganja U prvom redu 19 tjedana (od generacije F0 do valjenja generacije F2)
18. Biološke krajnje točke (primarne) Valjivost (F1 i F2); preživljavanje (F1, od valjenja do 4. tjedna nakon oplodnje (kraj razdoblja ličinki/početak razdoblja juvenilnih riba), od 4. do 9. (ili 10.) tjedna nakon oplodnje (od početka razdoblja juvenilnih riba do riba koje nisu odrasle) i od 9. do 15. tjedna nakon oplodnje (od razdoblja riba koje nisu odrasle do usmrćivanja odraslih riba)); rast (F1, dužina i masa 9. i 15. tjedna nakon oplodnje); sekundarna spolna obilježja (F1, papile na podrepanoj peraji 9. i 15. tjedna nakon oplodnje); vitelogenin (F1, vtg mRNA ili protein VTG 15. tjedna nakon oplodnje); fenotipski spol (F1, gonadnom histologijom 15. tjedna nakon oplodnje); reprodukcija (F0 i F1, potencijalna i stvarna plodnost za 21 dan); vrijeme mriješćenja (F1) i histopatologija (F1, gonade, jetra i bubreg 15. tjedna nakon oplodnje)
19. Kriteriji valjanosti ispitivanja Otopljeni kisik trebao bi iznositi ≥ 60 % vrijednosti zasićenosti kisikom; srednja temperatura vode od 24 do 26 °C tijekom cijelog ispitivanja; uspješna reprodukcija ≥ 65 % ženki u kontrolama; srednja dnevna potencijalna plodnost ≥ 20 jajašaca u kontrolama; valjivost ≥ 80 % (prosjeak) u kontrolama (i u generaciji F1 i F2); preživljavanje nakon valjenja do 3. tjedna nakon oplodnje ≥ 80 % (prosjeak) i od 3. tjedna nakon oplodnje do usmrćivanja za generaciju ≥ 90 % (prosjeak) u kontrolama (F1), koncentracije ispitivane kemikalije u otopini trebalo bi uspješno održavati u rasponu od ± 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti.

Dodatak 4.

SMJERNICE ZA TIPIČNE KONTROLNE VRIJEDNOSTI

Treba napomenuti da se te kontrolne vrijednosti temelje na ograničenom broju validacijskih studija i podliježu izmjeni u kontekstu stjecanja novog iskustva.

Rast

Masa i dužina mjere se kod svih riba koje se uzorkuju devet (ili deset) i 15 tjedana nakon oplodnje. Ako se slijedi ovaj protokol, očekuje se da će se devetog tjedna nakon oplodnje dobiti mokra masa od 85 do 145 mg za mužjake i od 95 do 150 mg za ženke. Očekuje se da će se 15. tjedna nakon oplodnje dobiti masa od 250 do 330 mg za mužjake i od 280 do 350 mg za ženke. Iako su moguća znatna odstupanja od tih raspona za pojedinačne ribe, srednje kontrolne mase koje su znatno izvan tih raspona, a osobito manje, ukazuju na poteškoće s hranjenjem, kontrolom temperature, kakvoćom vode, bolešću ili bilo kojom kombinacijom tih čimbenika.

Valjenje

Uspješnost valjenja u kontrolama obično iznosi približno 90 %, ali nisu neuobičajene ni niže vrijednosti od približno 80 %. Uspješnost valjenja manja od 75 % može ukazivati na nedovoljno protresanje jajašaca koja se razvijaju ili nedovoljan oprez pri postupanju s jajašcima, na primjer nepravovremeno uklanjanje mrtvih jajašaca koje je dovelo do gljivične infekcije.

Preživljavanje

Stope preživljavanja do tri tjedna nakon oplodnje od valjenja i nakon tri tjedna nakon oplodnje obično iznose 90 % ili više za kontrole, ali ni niže stope preživljavanja od približno 80 % u ranim fazama života u kontrolama nisu razlog za zabrinutost. Stope preživljavanja u kontrolama manje od 80 % razlog su za zabrinutost i mogu ukazivati na nedovoljno čišćenje akvarija koje je dovelo do gubitka ličinki zbog bolesti ili gušenja do kojeg je došlo zbog niskih razina otopljenog kisika. Smrtnost može biti i posljedica ozljeda tijekom čišćenja spremnika i gubitka ličinki zbog odvodnog sustava spremnika.

Gen za vitelogenin

Iako se apsolutne razine ekspresije gena za vitelogenin (*vgt*) izražene kao kopije/ng ukupnog mRNA mogu znatno razlikovati među laboratorijima zbog postupaka ili instrumenata koji se koriste, omjer za *vgt* trebao bi biti približno 200 puta veći kod kontrolnih ženki nego kod kontrolnih mužjaka. Nije neuobičajeno da se taj omjer kreće čak i u rasponu od 1 000 do 2 000, ali omjeri manji od 200 sumnjivi su i mogu ukazivati na poteškoće s kontaminacijom uzorka ili poteškoće s korištenim postupcima i/ili reagensima.

Sekundarna spolna obilježja

Kod mužjaka normalni raspon sekundarnih spolnih obilježja, koja se definiraju kao ukupan broj segmenata u šipčicama peraje papila na podrepanoj peraji, iznosi od 40 do 80 segmenata od devetog do desetog tjedna nakon oplodnje. Do 15. tjedna nakon oplodnje raspon za kontrolne mužjake treba biti od približno 80 do 120, a 0 za kontrolne ženke. Iz neobjašnjenih razloga u rijetkim slučajevima neki mužjaci ne razviju papile do 9. tjedna nakon oplodnje, ali budući da svi kontrolni mužjaci razvijaju papile do 15. tjedna nakon oplodnje, uzrok je vjerojatno zakašnjeli razvoj. Prisutnost papila kod kontrolnih ženki ukazuje na prisutnost mužjaka XX u populaciji.

Mužjaci XX

Čini se da je normalna osnovna učestalost pojave mužjaka XX u kulturi približno 4 % ili manje na temperaturi od 25 °C, a učestalost se povećava s povećanjem temperature. Treba poduzeti korake za smanjenje udjela mužjaka XX u populaciji. Budući da se čini da učestalost pojave mužjaka XX ima genetsku komponentu te je stoga nasljedna, praćenje matične kulture i osiguravanje da se mužjaci XX ne upotrebljavaju za razmnožavanje matične kulture učinkovit je način smanjenja učestalosti pojave mužjaka XX u populaciji.

Aktivnost mriješćenja

Aktivnost mriješćenja u kontrolnim ponavljanjima treba svakodnevno pratiti prije ocjenjivanja potencijalne plodnosti. Kontrolni parovi mogu se kvalitativno ocijeniti kako bi se dokazala aktivnost mriješćenja. Većina kontrolnih parova trebala bi se mrijestiti od 12. do 14. tjedna nakon oplodnje. Ako se do tog trenutka mrijesti malen broj parova, to ukazuje na moguće poteškoće sa zdravljem, zrelošću ili dobrobiti riba.

Potencijalna plodnost

Zdrave medake koje se dobro hrane trebale bi se svakodnevno mrijestiti od 12. do 14. tjedna nakon oplodnje, pri čemu bi trebale proizvoditi od 15 do 50 jajašaca dnevno. Proizvodnja jajašaca za 16 parova od 24 preporučena kontrolna uzgojna para (> 65 %) treba biti veća od 20 jajašaca po paru dnevno i može iznositi čak i 40 jajašaca dnevno. Manji broj jajašaca može ukazivati na nezrele, pothranjene ili nezdrave parove koji se mrijeste.

Plodnost

Postotak plodnih jajašaca za kontrolne parove koji se mrijeste obično je u rasponu od 90 %, a nisu neuobičajene ni veće vrijednosti. Stope plodnosti manje od 80 % za kontrolna jajašca sumnjive su i mogu ukazivati na jedinke koje nisu zdrave ili na uvjete uzgoja kulture koji nisu idealni.

Dodatak 5.

PRIMJER REŽIMA HRANJENJA

Primjer režima hranjenja kojim se osiguravaju primjereni rast i razvoj za potporu pouzdanoj reprodukciji prikazan je u Tablici 1. Odstupanja od tog režima hranjenja mogu biti prihvatljiva, ali preporučuje se da ih se ispita kako bi se potvrdilo da dolazi do prihvatljivog rasta i reprodukcije. Kako bi se slijedio predloženi režim hranjenja, prije početka ispitivanja treba utvrditi suhu masu račića *Artemia* po volumenu tekuće kaše račića. To se može napraviti vaganjem utvrđenog volumena tekuće kaše račića koja se sušila 24 sata na 60 °C na unaprijed odvaganim pliticama. Kako bi se uzela u obzir masa soli u tekućoj kaši, identičan volumen iste otopine soli koja se upotrebljava u tekućoj kaši treba sušiti, vagati i oduzeti od mase osušene kaše račića. Umjesto toga račići se mogu filtrirati i isprati destiliranom vodom prije sušenja, čime se uklanja potreba za mjerenjem mase same soli. Te se informacije upotrebljavaju za pretvaranje informacija iz tablice za suhu masu račića *Artemia* u volumen tekuće kaše račića koji se daje ribama. Osim toga, preporučuje se da se alikvoti tekuće kaše račića važu svakog tjedna kako bi se potvrdila točna suha masa račića koji se daju kao hrana.

Tablica 1.

Primjer režima hranjenja

Vrijeme (nakon valjenja)	Račići <i>Artemia</i> (mg suhe mase po ribi dnevno)
Dan 1.	0,5
Dan 2.	0,5
Dan 3.	0,6
Dan 4.	0,7
Dan 5.	0,8
Dan 6.	1,0
Dan 7.	1,3
Dan 8.	1,7
Dan 9.	2,2
Dan 10.	2,8
Dan 11.	3,5
Dan 12.	4,2
Dan 13.	4,5

Vrijeme (nakon valjenja)	Račići Artemia (mg suhe mase po ribi dnevno)
Dan 14.	4,8
Dan 15.	5,2
Dani 16.–21.	5,6
Četvrti tjedan	7,7
Peti tjedan	9,0
Šesti tjedan	11,0
Sedmi tjedan	13,5
Osmi tjedan – usmrćivanje	22,5

Dodatak 6.

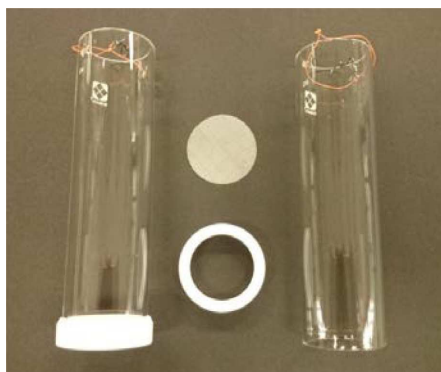
PRIMJER KOMORE ZA INKUBACIJU JAJAŠACA

Primjer A



Ovaj se inkubator sastoji od prerezane staklene cijevi centrifuge povezane rukavom od nehrđajućeg čelika, koju drži navojni čep centrifuge. Kroz čep viri malena cijev od stakla ili nehrđajućeg čelika koja je postavljena u blizini zaobljenog dna; ona dovodi mjehuriće zraka kojima se suspendiraju jajašca i smanjuje prijenos saprofitnih gljivičnih infekcija među jajašcima uz istovremeno olakšavanje razmjene kemikalija između inkubatora i spremnika.

Primjer B





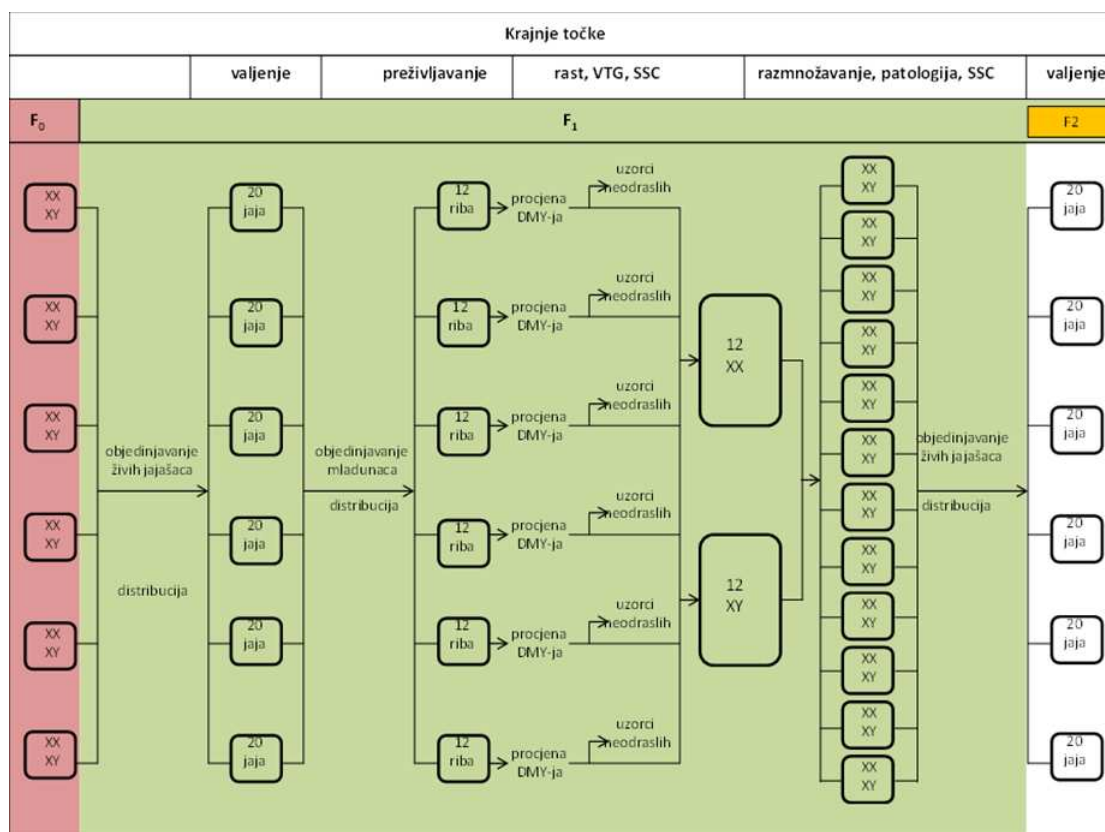
Ovaj inkubator sastoji se od staklene cilindrične osnove (promjer od 5 cm i visina od 10 cm) i nehrđajuće žičane mreže (0,25 ϕ i mrežice 32) koja se pričvršćuje na dno osnove PTFE prstenom. Inkubatori se mogu suspendirati na šipkama za podizanje u spremnicima i vertikalno protresati (amplituda od približno pet centimetara) u ciklusu (približno jednom svake četiri sekunde) koji je primjeren za jajašca medake.

Dodatak 7.

SHEMATSKI PRIKAZ ZA OBJEDINJAVANJE I POPUNJAVANJE PONAVLJANJA TIJEKOM CIJELE ISPITNE METODE MEOGRT

Slika 1.

Objedinjavanje i ponovno popunjavanje ponavljanja tijekom cijelog ispitivanja MEOGRT. Slika predstavlja jedno tretiranje ili polovinu kontrole. Zbog objedinjavanja identitet ponavljanja nije kontinuiran tijekom cijelog ispitivanja. Napominje se da se izraz „jajašca” odnosi na živa, oplođena jajašca (ekvivalentno embrijima)



Tretiranja i ponavljanje

Za ispitnu metodu preporučuje se pet tretiranja ispitivanom kemikalijom upotrebom materijala tehničkog stupnja čistoće i negativne kontrole. Broj ponavljanja po tretiranju nije isti tijekom cijelog ispitivanja MEOGRT te je broj ponavljanja u kontrolnoj tretiranju dvostruko veći od bilo kojeg pojedinačnog tretiranja ispitivanom kemikalijom. Kod generacije F₀ svako tretiranje ispitivanom kemikalijom ima šest ponavljanja, dok tretiranje negativnom kontrolom ima 12 ponavljanja. Ne preporučuje se upotreba otapala, a ako se ona upotrebljavaju, u izvješću o ispitivanju MEOGRT treba obrazložiti i zašto je otapalo potrebno i odabir specifičnog otapala. Isto tako, ako se upotrebljava otapalo, potrebne su dvije vrste kontrole: a) kontrola s otapalom i b) negativna kontrola. Te dvije kontrolne skupine trebale bi se sastojati od cijelog skupa ponavljanja u svim točkama vremenskog okvira ispitivanja MEOGRT. Ta struktura ponavljanja ostaje ista tijekom cijelog razvoja organizama iz generacije F₁ (i F₂ do valjenja). Međutim, u fazi odraslih riba, kada se uspostave uzgojni parovi generacije F₁, optimalno je da se broj ponavljanja parova za reprodukciju po tretiranju udvostruči; stoga u svakom tretiranju ispitivanom kemikalijom ima do 12 parova ponavljanja, a u kontrolnoj skupini 24 para ponavljanja (i po potrebi još 24 para ponavljanja u kontroli s otapalom). Utvrđivanje valjenja i embrija koje su izmijestili parovi generacije F₁ obavlja se prema istoj strukturi ponavljanja kao i za embrije koje su izmijestili parovi generacije F₀, što podrazumijeva prvo šest ponavljanja po tretiranju ispitivanom kemikalijom i 12 ponavljanja u kontrolnim skupinama.

Dodatak 8.

BROJANJE PAPILA NA PODREPNOJ PERAJI

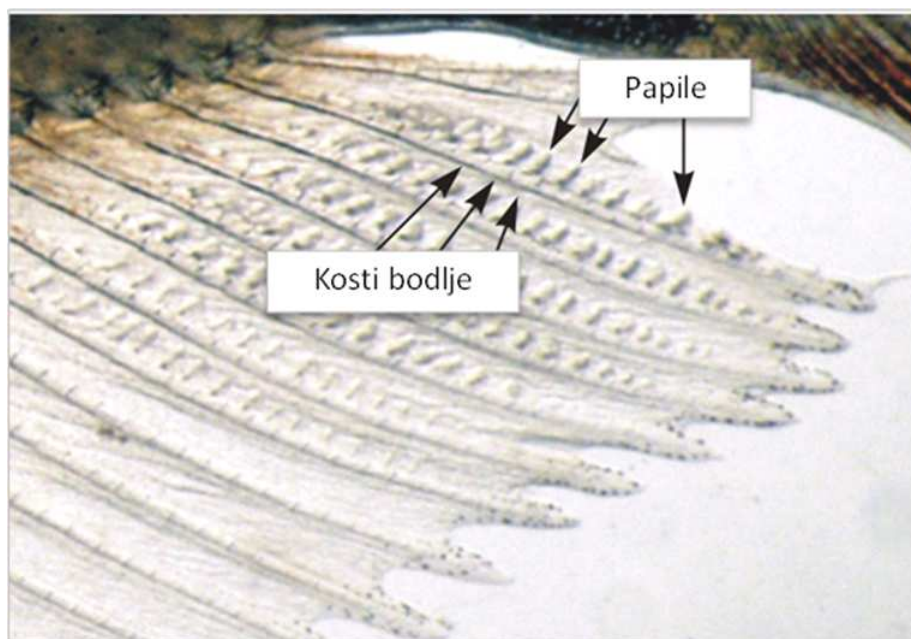
Glavni materijali i reagensi

- Disekcijski mikroskop (s pričvršćenom kamerom koja nije obvezna)
- Fiksativ (npr. Davidsonov fiksativ (ne preporučuje se Bouinov fiksativ)), ako se ne broji sa slike

Postupci

Nakon nekropsije treba slikati podrepnu peraju kako bi se omogućilo praktično brojanje papila na podrepnoj peraji. Iako je slikanje preporučena metoda, podrepna peraja može se fiksirati Davidsonovim fiksativom ili drugim odgovarajućim fiksativom približno jednu minutu. Važno je tijekom fiksacije držati podrepnu peraju ravnom kako bi se omogućilo lakše brojanje papila. Truplo s podrepnom perajom može se pohraniti u Davidsonovu fiksativu ili drugom odgovarajućem fiksativu do analize. Broji se broj kosti bodlje (vidjeti **sliku 1.**) s papilama koje vire na stražnjem dijelu kosti bodlje.

Slika 1.

Papile na podrepnoj peraji

Dodatak 9.

PODROBAN VREMENSKI OKVIR ISPITIVANJA MEOGRT

1.–3. ispitni tjedan (F0)

Ribe iz generacije F0 koje se mrijeste i koje su ispunile kriterije za odabir (vidjeti stavke od 16. do 20.) izlažu se tri tjedna kako bi se omogućilo izlaganje gameta i gonadnih tkiva u razvoju ispitivanoj kemikaliji. U svaki se spremnik s ponavljanjem stavlja jedan uzgojni par riba (uzgojni par ženke XX i mužjaka XY). Izmriješčena jajašca prikupljaju se, broje i procjenjuje se njihova plodnost tijekom 21 uzastopnog dana, počevši od prvog ispitnog dana.

4. ispitni tjedan (F0 i F1)

Preporučuje se da se oplodena i živa jajašca (embriji) prikupljaju istog dana; međutim, ako nema dovoljno embrija, mogu se prikupljati tijekom dva dana. Ako se prikupljaju dva dana, svi embriji u tretiranjima koji su prikupljeni prvog dana objedinjuju se s onima koji su prikupljeni drugog dana. Zatim se svi objedinjeni embriji za svako tretiranje nasumično raspodjeljuju u sve inkubatore ponavljanja tako da u svakom inkubatoru bude 20 embrija. Smrtnost oplodjenih jajašaca (embrija) svakodnevno se provjerava i evidentira. Mrtva jajašca uklanjaju se iz inkubatora (na smrt oplodjenih jajašaca može ukazivati, posebno u ranim stadijima, vidan gubitak prozirnosti i promjena boje zbog koagulacije i/ili taloženja proteina, što rezultira bjelkasto-mutnim izgledom; OECD 2010.).

Napomena: ako je za jednokratno tretiranje potreban drugi dan prikupljanja, kod svih se tretiranja (uključujući kontrole) mora poštovati taj postupak. Ako nakon drugog dana prikupljanja u tretiranju nema dovoljno embrija da bi se napunilo 20 embrija po inkubatoru, broj embrija kojima se pune inkubatori treba smanjiti na 15. Ako nema dovoljno embrija da bi se napunilo 15 embrija po inkubatoru, treba smanjiti broj ponavljanja inkubatora tako da bude dovoljno embrija za 15 embrija po inkubatoru. Osim toga, moglo bi se dodati više uzgojnih parova po tretiranju i kontrolama u generaciji F0 kako bi se dobilo više jajašaca i dosegao preporučeni broj od 20 jajašaca po ponavljanju.

Uzgojni parovi generacije F0 humano se usmrćuju 24. ispitnog dana te se evidentiraju njihova masa i duljina. Uzgojni parovi generacije F0 po potrebi se mogu držati još jedan ili dva dana kako bi se ponovno započela generacija F1.

5.–6. ispitni tjedan (F1)

Od jednog do dva dana prije predviđenog početka valjenja, treba zaustaviti ili smanjiti protresanje jajašaca koja se inkubiraju kako bi se ubrzalo valjenje. Budući da se embriji vale svakog dana, mladunci se objedinjuju prema tretiranju i sustavno raspodjeljuju u svaki spremnik s ponavljanjem za ličinke u okviru specifičnog tretiranja s najviše 12 mladunaca. To se obavlja nasumičnim odabirom mladunaca i stavljanjem pojedinačnih mladunaca u uzastopna ponavljanja neselektivnim izvlačenjem, krećući se redom kroz specifična ponavljanja tretiranja dok sva ponavljanja u okviru tretiranja ne budu imala 12 mladunaca. Ako nema dovoljno mladunaca da se popune sva ponavljanja, treba osigurati da što više ponavljanja ima 12 mladunaca da bi se započela faza F1.

Jajašca koja se ne izvale u razdoblju dvostruko duljem od srednjeg dana valjenja u kontroli smatraju se neodrživima te se odbacuju. Evidentira se broj mladunaca i računa se uspješnost valjenja (valjivost) u svakom ponavljanju.

7.–11. ispitni tjedan (F1)

Preživljavanje ličinki riba svakodnevno se provjerava i evidentira u svim ponavljanjima. Evidentira se broj preživjelih riba u svakom ponavljanju 43. ispitnog dana te početni broj mladunaca koji su stavljeni u ponavljanje (najbolje dvanaest). To omogućuje izračun postotka preživljavanja od valjenja do faze riba koje nisu odrasle.

12. ispitni tjedan (F1)

Od 78. do 85. ispitnog dana uzima se mali uzorak s repne peraje svake ribe kako bi se utvrdio genotipski spol jedinke (tj. obrezivanje peraja) za sve ribe. Te se informacije koriste za utvrđivanje uzgojnih parova.

U roku od tri dana od utvrđivanja genotipskog spola svake ribe, nasumično se utvrđuje 12 uzgojnih parova po tretiranju i 24 para po kontroli. Dvije ribe XX i XY iz svakog ponavljanja nasumično se odabiru i objedinjuju prema spolu te se zatim nasumično odabiru za uspostavu uzgojnog para (tj. par XX-XY). Uspostavlja se najmanje 12 ponavljanja po tretiranju kemikalijom i najmanje 24 ponavljanja za kontrolu s jednim uzgojnim parom po ponavljanju. Ako u ponavljanju ne postoje dvije ribe XX ili dvije ribe XY koje su dostupne za objedinjavanje, ribe s genotipom odgovarajućeg spola treba uzeti iz drugih ponavljanja u tretiranju.

Preostale ribe (najviše osam riba po ponavljanju) humano se usmrćuju i uzorkuju za različite krajnje točke riba koje nisu odrasle. Podaci o genu *dmy* (XX ili XY) za sve uzorke riba koje nisu odrasle zadržavaju se kako bi se osiguralo da se svi podaci o krajnjim točkama mogu povezati s genetskim spolom svake pojedinačne ribe.

13.–14. ispitni tjedan (F1)

Izlaganje se nastavlja kako se uzgojni parovi riba koje nisu odrasle razvijaju u odrasle ribe. Na 98. ispitni dan (tj. dan prije početka prikupljanja jajašaca) jajašca se uklanjaju i iz akvarija i sa ženki.

15.–17. ispitni tjedan (F1)

Izmriješčena jajašca prikupljaju se svakodnevno 21 uzastopan dan u svakom ponavljanju te se procjenjuju u pogledu potencijalne i stvarne plodnosti.

18. ispitni tjedan (ponavljanje 4. ispitnog tjedna) (F1 i F2)

Na 120. ispitni dan prikupljanje jajašaca obavlja se ujutro u svakom spremniku s ponavljanjem. Procjenjuju se prikupljena jajašca te se oplođena jajašca (uklonjeni filamenta) od svakog uzgojnog para objedinjuju prema tretiranju i sustavno distribuiraju u komore inkubatora jajašaca s 20 oplođenih jajašaca po inkubatoru. Inkubatori se mogu staviti u posebne „spremnike inkubatora” uspostavljene za svako tretiranje ili u spremnik s ponavljanjem u kojem će se ličinke držati nakon valjenja. Preporučuje se da se embriji prikupljaju istog dana; međutim, ako nema dovoljno embrija, mogu se prikupljati tijekom dva dana. Ako se prikupljaju dva dana, svi embriji u tretiranjima koji su prikupljeni prvog dana objedinjuju se s onima koji su prikupljeni drugog dana. Zatim se svi objedinjeni embriji za svako tretiranje nasumično raspodjeljuju u sve inkubatore ponavljanja tako da u svakom inkubatoru bude 20 embrija. Napomena: ako je za jednokratno tretiranje potreban drugi dan prikupljanja, kod svih se tretiranja (uključujući kontrole) mora poštovati taj postupak. Ako nakon drugog dana prikupljanja u tretiranju nema dovoljno embrija da bi se napunilo 20 embrija po inkubatoru, broj embrija kojima se pune inkubatori treba smanjiti na 15. Ako nema dovoljno embrija da bi se napunilo 15 embrija po inkubatoru, treba smanjiti broj ponavljanja inkubatora tako da bude dovoljno embrija za 15 embrija po inkubatoru.

Na 121. ispitni dan (ili 122. ispitni dan, kako bi se osiguralo da se generacija F2 dobro započne) uzgojni parovi generacije F1 humano se usmrćuju i analiziraju u pogledu krajnjih točaka odraslih riba. Uzgojni parovi generacije F1 po potrebi se mogu držati još jedan ili dva dana kako bi se ponovno započela generacija F2.

19.–20. ispitni tjedan (F2)

Od jednog do dva dana prije predviđenog početka valjenja, treba zaustaviti ili smanjiti protresanje jajašaca koja se inkubiraju kako bi se ubrzalo valjenje. Ako ispitivanje završi dovršetkom valjenja generacije F2, mladunci se evidentiraju i odbacuju (embriji koji se ne izvale nakon produženog vremena inkubacije, koje se definira kao razdoblje dvostruko dulje od srednjeg dana valjenja u kontroli, smatraju se neodrživima).

Dodatak 10.

STATISTIČKA ANALIZA

Vrste bioloških podataka koji nastanu u ispitivanju MEOGRT nisu jedinstveni za to ispitivanje i, osim za patološke podatke, razvijene su mnoge primjerene statističke metodologije za pravilnu analizu sličnih podataka ovisno o značajkama podataka, među ostalim, normalnosti, homogenosti varijance, omogućuje li plan studije ispitivanje hipoteza ili regresijsku analizu, parametrijska ispitivanja u odnosu na neparametrijska itd. Općenito, u predloženim statističkim metodama poštuju se preporuke OECD-a za podatke o ekotoksičnosti (OECD, 2006.), a na slici 2. može se vidjeti grafikon odluke za analizu podataka dobivenih ispitivanjem MEOGRT.

Pretpostavlja se da će skupovi podataka najčešće pokazivati monotonične odgovore. Osim toga, treba razmotriti pitanje upotrebe jednosmjernog statističkog testiranja ili dvosmjernog statističkog testiranja. Predlaže se upotreba jednosmjernih statističkih testiranja osim ako postoji biološki razlog zbog kojeg ono ne bi bilo primjereno. Iako se u sljedećem odjeljku predlažu određeni statistički testovi, ako se razviju primjerenije i/ili snažnije statističke metode za primjenu na specifičnim podacima koji se dobiju ispitivanjem MEOGRT, upotrebljavali bi se ti statistički testovi kako bi se iskoristile te prednosti.

Podatke dobivene ispitivanjem MEOGRT treba analizirati zasebno za svaki genotipski spol. Postoje dvije strategije za analizu podataka o ribama s promijenjenim spolom (mužjaci XX ili ženke XY): 1) isključivanje svih podataka o ribama s promijenjenim spolom iz cijelog ispitivanja, osim učestalosti pojave promjene spola u svakom ponavljanju; 2) zadržavanje podataka o svim ribama s promijenjenim spolom u skupu podataka i analiza na temelju genotipa.

Histopatološki podaci

Histopatološki podaci navode se kao ocjene ozbiljnosti koje se procjenjuju upotrebom novog statističkog postupka – RSCABS (engl. *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices*), (Green i dr., 2014.). U prilagodbama *Rao-Scottova* postupka zadržavaju se informacije iz ponavljanja ispitivanja; postupak *u dijelovima* (engl. *by Slices*) uključuje biološko očekivanje da se ocjene ozbiljnosti obično povećavaju s povećanjem koncentracija u tretiranjima. Za svaku se dijagnozu u ishodu RSCABS-a navodi kod kojih se tretiranja javlja veća učestalost pojave patologije nego u kontrolama te povezane razine ozbiljnosti.

Podaci o potencijalnoj plodnosti

Analize za podatke o potencijalnoj plodnosti sastoje se od Jonckheere-Terpstraova ili Williamsova testa postupnog snižavanja kako bi se utvrdili učinci tretiranja, pod uvjetom da su podaci usklađeni s monotoničnim odgovorom na koncentraciju. Kod testa postupnog snižavanja sve se usporedbe obavljaju pri razini značajnosti od 0,05 i nema prilagodbi za broj usporedbi. Očekuje se da su podaci usklađeni s monotoničnim odgovorom na koncentraciju, ali to se može provjeriti vizualnim pregledom podataka ili izradom linearnih i kvadratnih kontrasta srednjih vrijednosti tretiranja nakon transformacije podataka u redoslijed rangova. Test trenda dovršen je osim ako je kvadratni kontrast značajan, a linearni kontrast nije značajan. U suprotnom se obavlja Dunnettov test kako bi se utvrdili učinci tretiranja ako su podaci normalno distribuirani s homogenim varijancama. Ako ti zahtjevi nisu ispunjeni, upotrebljava se Dunnettov test s Bonferroni-Holmovom prilagodbom. Svi navedeni testovi obavljaju se neovisno o bilo kakvom općem F-testu ili Kruskal-Wallisovu testu. Dodatne pojedinosti nalaze se u OECD-ovoj publikaciji iz 2006.

Mogu se koristiti i alternativne metode, kao što su općeniti linearni model s Poissonovim pogreškama za brojeve jajašaca (bez transformacije), ako se to statistički obrazloži (Cameron i Trividi, 2013.). Ako se upotrebljava alternativni pristup, preporučuje se statističko savjetovanje.

Dnevni broj jajašaca u jednoj generaciji

Model ANOVA računa se kao $Y = \text{Vrijeme} * \text{Vrijeme} + \text{Tretiranje} + * \text{Tretiranje} + \text{Vrijeme} * \text{Tretiranje} + * \text{Vrijeme} * \text{Tretiranje}$, s nasumičnim učincima ponavljanja (Generacija * Tretiranje) i Vrijeme * Ponavljanje (Tretiranje), pri čemu se dopuštaju nejednake komponente varijance oba tipa kroz generacije. Vrijeme se ovdje odnosi na učestalost brojenja jajašaca (npr. dan ili tjedan). Ovo je analiza ponovljenog mjerenja, s korelacijama između opažanja na istim ponavljanjima kojima se uzima u obzir priroda ponovljenih mjerenja podataka.

Glavni učinci tretiranja ispituju se upotrebom Dunnettova (ili Dunnett-Hsuova) testa, kojim se prilagođava broj usporedbi. Potrebne su prilagodbe za glavni učinak generacije ili vremena jer za ta dva čimbenika ne postoji razina „kontrola” i svaki je par razina usporedba od mogućeg interesa. U slučaju tih dvaju glavnih učinaka, ako je F-test za glavni učinak značajan na razini od 0,05, usporedbe u parovima među razinama tog čimbenika zatim se mogu ispitati na razini od 0,05 bez daljnje prilagodbe.

Model uključuje interakcije s dva i tri čimbenika, tako da glavni učinak za, na primjer, vrijeme, ne može biti značajan iako vrijeme znatno utječe na rezultate. Stoga, ako je interakcija s dva ili tri čimbenika koja uključuje vrijeme značajna na razini od 0,05, mogu se prihvatiti usporedbe razina vremena na razini značajnosti od 0,05 bez daljnje prilagodbe.

Zatim slijede F-testovi za značajnost tretiranja u vremenu, takozvani dijelovi u tablici ANOVA. Ako je, na primjer, dio za tretiranje u generaciji F1 i vremenu 12 značajan na razini od 0,05, usporedbe u parovima za tretiranje u generaciji F1 i vremenu 12 mogu se prihvatiti na razini od 0,05 bez daljnje prilagodbe. Slične izjave primjenjuju se na testove za vrijeme u generaciji F1 i tretiranju te za generaciju u okviru vremena i tretiranja.

Naposlijetku, u slučaju usporedbi koje ne pripadaju nijednoj od prethodno navedenih kategorija, usporedbe treba prilagoditi upotrebom Bonferroni-Holmove prilagodbe p-vrijednostima. Daljnje informacije o analizama tih modela mogu se pronaći u Hocking (1985.) te Hochberg i Tamhane (1987.).

Umjesto toga, neobrađeni podaci evidentiraju se i prikazuju u izvješću o studiji kao potencijalna plodnost (broj jajašaca) po ponavljanju za svaki dan. Treba izračunati srednju vrijednost ponavljanja iz neobrađenih podataka i zatim primijeniti drugi korijen transformacija. Treba izračunati jednosmjernu ANOVA-u na transformiranim srednjim vrijednostima ponavljanja, nakon čega slijede Dunnettovi kontrasti. Može biti korisno i vizualno pregledati podatke o potencijalnoj plodnosti svakog tretiranja i/ili ponavljanja s pomoću dijagrama raspršenosti na kojem se prikazuju podaci kroz vrijeme. Time će se omogućiti neformalna procjena potencijalnih učinaka kroz vrijeme.

Svi ostali biološki podaci

Statističke analize temelje se na temeljnoj pretpostavci da će podaci biti monotonični ako je doza pravilno odabrana. Stoga se pretpostavlja da su podaci monotonični te se oni formalno procjenjuju u pogledu monotoničnosti upotrebom linearnih i kvadratnih kontrasta. Ako su podaci monotonični, preporučuje se Jonckheere-Terpstraov test trenda na srednjim vrijednostima ponavljanja (kako se savjetuje u publikaciji OECD-a iz 2006.). Ako je kvadratni kontrast značajan, a linearni kontrast nije, smatra se da podaci nisu monotonični.

Ako podaci nisu monotonični, osobito zbog smanjenog odgovora najvišeg tretiranja ili prva dva najviša tretiranja, treba razmotriti isključivanje tih tretiranja iz skupa podataka za analizu. Za tu odluku potrebna je stručna prosudba i svi dostupni podaci, posebno podaci koji ukazuju na očitu toksičnost na tim razinama tretiranja.

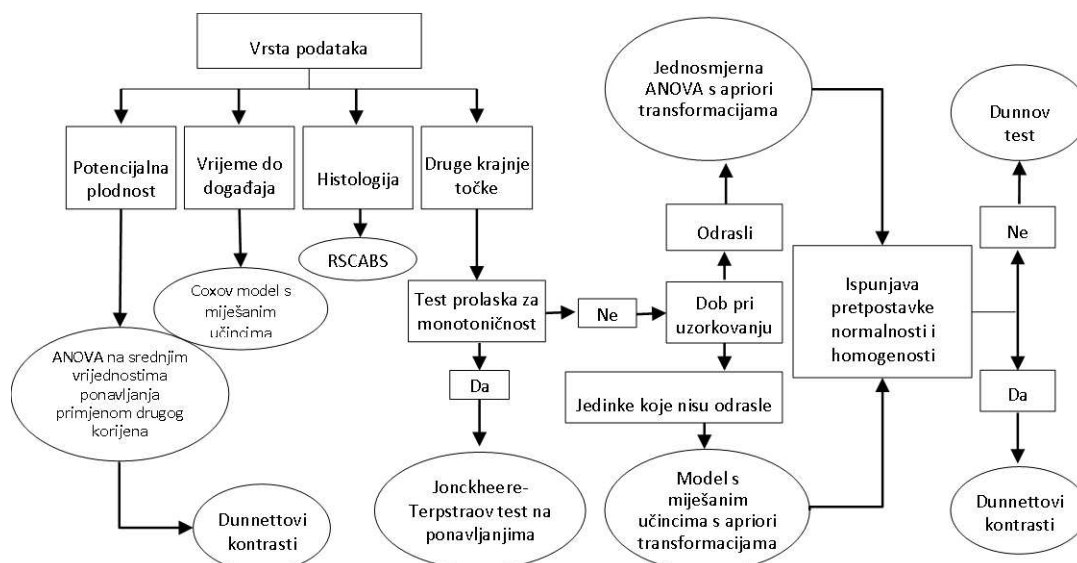
Za masu i dužinu ne preporučuju se nikakve prilagodbe, iako ponekad mogu biti potrebne. Međutim, za podatke o vitelogeninu preporučuje se log transformacija; za podatke o SSC-u preporučuje se log transformacija (papile na podrepnoj peraji); za podatke o udjelu valjenja, postotku preživljavanja, omjeru spolova i postotku plodnih jajašaca preporučuje se transformacija arkus sinusa drugog korijena. Vrijeme do valjenja i vrijeme do prvog mriješćenja treba tretirati kao podatke o vremenu do događaja, pri čemu se pojedinačni embriji koji se ne izvale u utvrđenom razdoblju ili ponavljanja u kojima ne dođe do mriješćenja tretiraju kao podaci koji se cenzuriraju desno. Vrijeme do valjenja treba računati od srednjeg dana valjenja svakog ponavljanja. Te krajnje točke treba analizirati upotrebom Coxova modela proporcionalne opasnosti s miješanim učincima.

Biološki podaci uzoraka odraslih riba imaju jedno mjerenje po ponavljanju, odnosno postoji jedna riba XX i jedna riba XY po akvariju s ponavljanjem. Stoga se preporučuje da se na srednjim vrijednostima ponavljanja provede jednosmjerna ANOVA. Ako se ispune pretpostavke ANOVA-e (normalnost i homogenost varijanci, kako su procijenjeni na rezidualima ANOVA-e Shapiro-Wilksovim odnosno Leveneovim testom), treba upotrijebiti Dunnettove kontraste kako bi se utvrdila tretiranja koja su različita od kontrole. S druge strane, ako se ne ispune pretpostavke ANOVA-e, treba provesti Dunnettov test kako bi se utvrdilo koja su tretiranja različita od kontrole. Sličan se postupak preporučuje za podatke koji su u obliku postotaka (plodnost, valjenje i preživljavanje).

Biološki podaci uzoraka riba koje nisu odrasle imaju od jednog do osam mjerenja po ponavljanju, odnosno može postojati različit broj jedinki koje pridonose srednjoj vrijednosti ponavljanja za svaki genotipski spol. Stoga se preporučuje upotreba modela ANOVA s miješanim učincima, nakon čega slijede Dunnettovi kontrasti ako su ispunjene pretpostavke normalnosti i homogenosti varijanci (na rezidualima ANOVA-e s miješanim učincima). Ako one nisu ispunjene, treba provesti Dunnettov test kako bi se utvrdilo koja su tretiranja različita od kontrole.

Slika 2.

Dijagram toka za preporučene statističke postupke za analizu podataka u ispitivanju MEOGRT



LITERATURA

1. OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (prilozi ovoj publikaciji postoje kao zasebni dokument), OECD Publishing, Pariz.
2. Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.
3. Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.
4. Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53. TEST RASTA I RAZVOJA VODOZEMACA U FAZI LIČINKI (LAGDA)**UVOD**

1. Ova ispitna metoda odgovara Smjernici OECD-a za ispitivanje 241 (2015.). Potreba za razvojem i validacijom testa kojim se mogu identificirati i opisati štetne posljedice izlaganja toksičnim kemikalijama u vodozemaca pojavila se zbog zabrinutosti da razine kemikalija u okolišu mogu štetno utjecati i na ljude i na životinje. U Smjernici OECD-a za ispitivanje pod nazivom Test rasta i razvoja vodozemaca u fazi ličinki (LAGDA, engl. *Larval Amphibian Growth and Development Assay*) opisuje se toksikološko ispitivanje s vrstom vodozemaca u kojem se razmatraju rast i razvoj od oplodnje i tijekom ranog juvenilnog razdoblja. To je test (obično 16 tjedana) u kojem se procjenjuju rani razvoj, metamorfoza, preživljavanje, rast i djelomično reproduktivno sazrijevanje. U njemu se omogućuje i mjerenje skupa drugih krajnjih točaka koje omogućuju dijagnostičku ocjenu kemikalija za koje se sumnja da su endokrino disruptivne ili drugih vrsta razvojnih i reproduktivnih toksikanata. Metoda opisana u ovoj ispitnoj metodi izvedena je iz validacijske studije s afričkom pandžašicom (*Xenopus laevis*) koju je provela Agencija SAD-a za zaštitu okoliša (U.S. EPA) uz popratni rad obavljen u Japanu (1.). Iako se druge vrste vodozemaca mogu prilagoditi protokolu testa rasta i razvoja, pri čemu je mogućnost utvrđivanja genetskog spola važna sastavnica, specifične metode i krajnje točke promatranja opisane u ovoj ispitnoj metodi primjenjive su samo na vrstu *Xenopus laevis*.
2. LAGDA služi kao ispitivanje više razine na vodozemcima za prikupljanje sveobuhvatnijih informacija o odnosu koncentracije i odgovora u pogledu štetnih učinaka, a primjereno je za identifikaciju i opis opasnosti te za procjenu rizika za okoliš. Test pripada četvrtoj razini OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih kemikalija, na kojoj *in vivo* testovi pružaju i informacije o štetnim učincima na relevantne endokrine krajnje točke (2.). Opći plan izvođenja pokusa obuhvaća izlaganje embrija vrste *X. laevis* u 8.–10. stadiju prema Nieuwkoopu i Faberu (NF) (3.) najmanje četirima različitim koncentracijama ispitivane kemikalije (obično raspoređene barem u polulogaritamske intervale) i kontrolama do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli, s jednim međuvremenim poduzorkom u 62. stadiju NF-a (≤ 45 nakon oplodnje; obično približno 45 dana (dana nakon oplodnje)). Svaka se ispitivana koncentracija sastoji od četiri ponavljanja s osam ponavljanja za kontrolu. Krajnje točke koje se ocjenjuju tijekom izlaganja (kod međuvremenog poduzorka i konačnog uzorka na kraju ispitivanja) uključuju točke koje ukazuju na opću toksičnost: smrtnost, abnormalno ponašanje i utvrđivanja rasta (duljina i masa) te krajnje točke koje su osmišljene za opis specifičnih načina djelovanja endokrine toksičnosti koji su usmjereni na fiziološke procese kojima posreduje estrogen, androgen ili hormon štitnjače. U metodi se najveća važnost pridaje učincima koji su potencijalno relevantni za populaciju (točnije, štetnim učincima na preživljavanje, razvoj, rast i reproduktivni razvoj) za izračun najviše koncentracije bez vidljivog učinka (NOEC) ili koncentracije s x-postotnim učinkom (ECx) na krajnjoj točki koja se mjeri. Iako treba napomenuti da su pristupi u kojima se upotrebljava ECx rijetko primjereni za velike studije ove vrste kod kojih povećanje broja ispitnih koncentracija kako bi se omogućilo utvrđivanje željenog ECx može biti nepraktično. Treba napomenuti i da metodom nije obuhvaćena sama reproduktivna faza. Definicije koje se upotrebljavaju u ovoj ispitnoj metodi navedene su u Dodatku 1.

POČETNA RAZMATRANJA I OGRANIČENJA

3. Zbog ograničenog broja ispitanih kemikalija i laboratorija uključenih u validaciju ovog poprilično složenog testa (osobito obnovljivost između više laboratorija za sada nije dokumentirana s eksperimentalnim podacima) predviđa se da će se Smjernica OECD-a za ispitivanje 241 revidirati i, prema potrebi, prilagoditi stečenom iskustvu kada za utvrđivanje učinka ovog novog dizajna studije bude dostupan dovoljan broj studija. LAGDA je važan test za rasvjetljavanje čimbenika koji potencijalno pridonose smanjenju populacije vodozemaca procjenom učinaka izlaganja kemikalijama tijekom osjetljivog stadija ličinke, u kojem učinci na preživljavanje i razvoj, uključujući normalan razvoj reproduktivnih organa, mogu štetno utjecati na populacije.
4. Ispitivanje je osmišljeno za otkrivanje apikalnih učinaka koji su rezultat i endokrinih mehanizama i mehanizama koji nisu endokrini te uključuje dijagnostičke krajnje točke koje su djelomično specifične za ključne endokrine modalitete. Treba napomenuti da prije razvoja testa LAGDA nije postojao validirani test koji je služio toj svrsi za vodozemce.
5. Prije započinjanja testa važno je imati informacije o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije, osobito kako bi se omogućilo dobivanje stabilnih otopina kemikalija. Važno je i imati dovoljno osjetljivu analitičku metodu za provjeru koncentracija ispitivane kemikalije. Za test, koji traje približno 16 tjedana, potrebno je ukupno 480 životinja, tj. embrija vrste *X. laevis* (ili 640 embrija ako se upotrebljava kontrola s otapalom) kako bi se osigurala dovoljna snaga ispitivanja za ocjenu krajnjih točaka koje su relevantne za populaciju, kao što su rast, razvoj i reproduktivno sazrijevanje.
6. Prije primjene ispitne metode za regulatorno ispitivanje smjese trebalo bi razmotriti hoće li se njome dobiti prihvatljivi rezultati za predviđenu regulatornu svrhu. Nadalje, ovim se testom potencijalna plodnost ne ocjenjuje izravno pa možda neće biti primjenjiv za upotrebu na razini višoj od četvrte razine OECD-ova konceptualnog okvira za ispitivanje i procjenu endokrino disruptivnih tvari.

ZNANSTVENA OSNOVA ZA ISPITNU METODU

7. Velik dio trenutačnih spoznaja o biologiji vodozemaca dobiven je upotrebom ogledne laboratorijske vrste *X. laevis*. Ta se vrsta može rutinski uzgajati u laboratoriju, ovulacija se može inducirati upotrebom humanog korionskog gonadotropina (hCG) i zalihe životinja lako su dostupne kod komercijalnih uzgajivača.
8. Kao i kod svih kralježnjaka, razmnožavanje vodozemaca pod kontrolom je osi hipotalamus-hipofiza-gonade (HPG) (4.). Estrogeni i androgeni posrednici su tog endokrinog sustava, koji određuju razvoj i fiziologiju spolno dimorfnih tkiva. U životnom ciklusu vodozemaca postoje tri posebne faze kada je ta os osobito aktivna: 1. gonadna diferencijacija tijekom razvoja ličinki, 2. razvoj sekundarnih spolnih obilježja i gonadno sazrijevanje tijekom juvenilne faze te 3. funkcionalno razmnožavanje odraslih jedinki. Sve te točke u razvoju vjerojatno su osjetljive na endokrine poremećaje koje uzrokuju određene kemikalije kao što su estrogeni i androgeni, što naposljetku dovodi do gubitka reproduktivne sposobnosti organizama.
9. Gonade se počinju razvijati u 43. stadiju NF-a, kada se prvo razvija bipotencijalni genitalni greben. Diferencijacija gonada počinje u 52. stadiju NF-a, kada primordijalne zametne stanice migriraju u medularno tkivo (mužjaci) ili ostaju u kortikalnoj regiji (ženke) gonada u razvoju (3.). Prvi je put navedeno da je taj proces spolne diferencijacije gonada osjetljiv na kemijske promjene kod roda *Xenopus* pedesetih godina 20. stoljeća (5. i 6.). Izlaganje punoglavaca estradiolu tijekom tog razdoblja diferencijacije gonada dovodi do promjene spola mužjaka koji postaju potpuno funkcionalne ženke kada dosegnu odraslu dob (7. i 8.). Moguća je i funkcionalna promjena spola ženki u mužjake i navedeno je da do nje dolazi nakon implantacije tkiva testisa kod punoglavaca (9.). Međutim, iako izlaganje

inhibitoru aromataze uzrokuje funkcionalnu promjenu spola i kod vrste *X. tropicalis* (10.), nije dokazano da do toga dolazi i kod vrste *X. laevis*. U prijašnjim su se ispitivanjima učinci toksičnih tvari na gonadnu diferencijaciju procjenjivali histološkim ispitivanjem gonada pri metamorfozi i promjena spola mogla se utvrditi samo analizom omjera spolova. Donedavno nisu postojala sredstva za izravno utvrđivanje genetskog spola kod roda *Xenopus*. Međutim, nedavno su kod vrste *X. laevis* utvrđeni markeri povezani sa spolom, što omogućuje utvrđivanje genetskog spola i omogućuje izravnu identifikaciju životinja koje su promijenile spol (11.).

10. Razvoj mladih mužjaka nastavlja se s povećanjem razina testosterona u krvi koje odgovara razvoju sekundarnih spolnih obilježja te razvoju testisa. Kod ženki jajnici proizvode estradiol, što dovodi do pojave vitelogenina (VTG) u plazmi, vitelogenih jajnih stanica u jajniku i razvoja jajovoda (12.). Jajovodi su sekundarno spolno obilježje ženki koji djeluju u sazrijevanju jajnih stanica tijekom reprodukcije. Želatinozni omotači prijanjaju uz vanjsku površinu jajnih stanica dok one prolaze kroz jajovod i sakupljaju se u vrećici s jajašcima te su spremne za oplodnju. Čini se da razvojem jajovoda upravljaju estrogene jer je razvoj u korelaciji s razinama estradiola u krvi kod vrsta *X. laevis* (13.) i *X. tropicalis* (12.). Navedeno je da dolazi do razvoja jajovoda u mužjaka nakon izlaganja spojevima polikloriranih bifenila (14.) i 4-*tert*-oktilfenolu (15.).

NAČELO ISPITIVANJA

11. Plan ispitivanja obuhvaća izlaganje embrija vrste *X. laevis* u 8.–10. stadiju NF-a putem vode različitim koncentracijama ispitivane kemikalije te kontrolama do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli s jednim međuvremenim poduzorkom u 62. stadiju NF-a. Iako je jako hidrofobne kemikalije moguće dozirati u hrani, zasada je iskustvo u upotrebi tog načina izlaganja u ovom testu ograničeno. Svaka se ispitivana koncentracija sastoji od četiri ponavljanja s osam ponavljanja za svaku upotrijebljenu kontrolu. Krajnje točke koje se ocjenjuju tijekom izlaganja uključuju one koje ukazuju na opću toksičnost (tj. smrtnost, abnormalno ponašanje i utvrđivanja rasta (duljina i masa)) te krajnje točke koje su osmišljene za opis specifičnih načina djelovanja endokrine toksičnosti koji su usmjereni na fiziološke procese kojima posreduje estrogen, androgen ili hormon štitnjače (tj. histopatologija štitnjače, histopatologija gonada i gonadnih kanala, abnormalan razvoj, vitelogenin u plazmi (neobavezno) i omjeri genotipskog/fenotipskog spola).

KRITERIJI VALJANOSTI ISPITIVANJA

12. Primjenjuju se sljedeći kriteriji za valjanost ispitivanja:

- tijekom cijelog ispitivanja koncentracija otopljenog kisika trebala bi iznositi ≥ 40 % vrijednosti zasićenosti kisikom,
- temperatura vode treba biti u rasponu od 21 ± 1 °C i razlike između ponavljanja i između tretiranja ne bi trebale biti veće od 1,0 °C,
- pH-vrijednost ispitivane otopine treba održavati u rasponu od 6,5 do 8,5 i razlike između ponavljanja i između tretiranja ne bi trebale biti veće od 0,5,
- trebali bi postojati dokazi da su se koncentracije ispitivane kemikalije u otopini uspješno održavale u rasponu od ± 20 % srednjih izmjerenih vrijednosti,
- smrtnost tijekom razdoblja izlaganja treba biti ≤ 20 % u svakom ponavljanju u kontrolama,

- vijabilnost $\geq 70\%$ u mrijestu koji je odabran za započinjanje studije,
 - srednje vrijeme do 62. stadija NF-a kontrola treba biti ≤ 45 dana,
 - srednja masa ispitnih organizama u 62. stadiju NF-a i na kraju testa treba dosegnuti $1,0 \pm 0,2$ g u kontrolama i $11,5 \pm 3$ g u kontrolama s otapalom (ako se upotrebljavaju).
13. Iako to nije kriterij valjanosti, preporučuje se da za analizu budu dostupne najmanje tri razine tretiranja s tri nekompromitirana ponavljanja. Visoka smrtnost, koja kompromitira tretiranje, definira se kao > 4 smrtna slučaja ($> 20\%$) u dva ili više ponavljanja koji se ne mogu objasniti tehničkom pogreškom. Za analizu bi trebale biti dostupne najmanje tri razine tretiranja bez jasnih znakova očite toksičnosti. Znakovi očite toksičnosti mogu uključivati, ali nisu ograničeni na, plutanje na površini, ležanje na dnu spremnika, obrnuto ili nepravilno plivanje, neizlaženje na površinu i nereagiranje na poticaje, morfološke abnormalnosti (npr. deformacije udova), hemoragijske lezije i abdominalne edeme.
14. Ako se uoči odstupanje od kriterija valjanosti ispitivanja, potrebno je razmotriti posljedice u odnosu na pouzdanost rezultata ispitivanja te ta odstupanja i razmatranja uključiti u izvješće o ispitivanju.

OPIS METODA

Oprema

15. Uobičajena laboratorijska oprema, posebno:
- (a) uređaji za kontroliranje temperature (npr. grijači ili hladnjaci podesivi na 21 ± 1 °C);
 - (b) termometar;
 - (c) binokularni disekcijski mikroskop i pribor za seciranje;
 - (d) digitalni fotoaparat s najmanje četiri megapiksela razlučivosti i mikrofunkcijom (ako je potrebno);
 - (e) analitička vaga s mogućnošću mjerenja do 0,001 mg ili 1 µg;
 - (f) mjerač otopljenog kisika i pH-vrijednosti;
 - (g) mjerač intenziteta svjetlosti s mogućnošću mjerenja u luksima.

Voda

Izvor i kvaliteta

16. Može se upotrebljavati bilo koja voda za razrjeđivanje koja je lokalno dostupna (npr. izvorska voda ili voda iz slavine filtrirana ugljenom) i omogućuje normalan rast i razvoj vrste *X. laevis* te trebaju biti dostupni dokazi o normalnom rastu u toj vodi. Budući da se kakvoća lokalne vode može znatno razlikovati od jednog do drugog područja, potrebno je provesti analizu kakvoće vode, pogotovo ako nisu dostupni prijašnji podaci o korisnosti vode za uzgoj ličinki vodozemaca. Mjerenje teških metala (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih aniona i kationa (npr. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pesticida, ukupnog organskog ugljika i suspendirane krute tvari treba provoditi prije početka ispitivanja i/ili npr. svakih šest mjeseci ako se zna da je voda za razrjeđivanje relativno stalne kakvoće. Neka kemijska svojstva prihvatljive vode za razrjeđivanje navedena su u Dodatku 2.

Koncentracija jodida u ispitnoj vodi

17. Kako bi štitnjača sintetizirala hormone štitnjače i podržala normalnu metamorfozu, ličinkama treba biti dostupno dovoljno jodida koji se dobiva iz vode i hrane. Trenutačno ne postoje empirijski izvedene smjernice za najmanje koncentracije jodida u hrani ili vodi kojima se osigurava pravilan razvoj. Međutim, dostupnost jodida može utjecati na reakciju tiroidnog sustava na aktivna sredstva i poznato je da modulira bazalnu aktivnost štitnjače, što zaslužuje pozornost pri tumačenju rezultata histopatologije štitnjače. Na temelju prethodnog rada, uspješna provedba testa dokazana je kada je raspon koncentracija jodida (I^-) u vodi za razrjeđivanje od 0,5 do 10 $\mu\text{g/l}$. Idealno bi najmanja koncentracija jodida u vodi za razrjeđivanje tijekom cijelog ispitivanja trebala iznositi 0,5 $\mu\text{g/l}$ (dodan u obliku natrijeve ili kalijeve soli). Ako se ispitna voda pomiješa s deioniziranom vodom, potrebno je dodati jod u minimalnoj koncentraciji od 0,5 $\mu\text{g/l}$. Treba izvijestiti o izmjenjenim koncentracijama jodida u ispitnoj vodi (tj. vodi za razrjeđivanje) i dodavanju joda ili drugih soli (ako se upotrebljavaju) ispitnoj vodi. Osim u ispitnoj vodi, udio joda može se mjeriti i u hrani.

Sustav izlaganja

18. Ispitivanje je razvijeno upotrebom protočnog sustava za razrjeđivanje. Sastavnice sustava koje dolaze u dodir s vodom trebale bi biti od stakla, nehrđajućeg čelika i/ili drugih kemijski inertnih materijala. Spremnici za izlaganje trebaju biti akvariji od stakla ili nehrđajućeg čelika, a iskoristivi volumen spremnika trebao bi biti od 4,0 do 10,0 l (najmanja dubina vode od 10 do 15 cm). Sustav bi trebao moći podržati sve koncentracije u izlaganjima, kontrolu i kontrolu s otapalom, ako je potrebna, s četiri ponavljanja po tretiranju i osam ponavljanja u kontrolama. Brzina protoka za svaki spremnik trebala bi biti konstantna s obzirom na održavanje bioloških uvjeta i izlaganje kemikaliji. Preporučuju se primjerene brzine protoka (npr. najmanje pet izmjena vode u spremniku dnevno) kako bi se izbjegla smanjenja koncentracije kemikalija zbog metabolizma ispitnih organizama i vodenih mikroorganizama prisutnih u akvariju ili abiotičkih načina razgradnje (hidroliza, fotoliza) ili gubitka (hlapljenje, sorpcija). Spremnici za tretiranje treba nasumično dodijeliti položaj u sustavu izlaganja kako bi se izbjegli mogući učinci položaja, uključujući male razlike u temperaturi, intenzitetu svjetlosti itd. Daljnje informacije o uspostavi protočnih sustava izlaganja mogu se pronaći u Standardnom vodiču za provođenje ispitivanja akutne toksičnosti na ispitivanim materijalima s ribama, makrobeskralježnjacima i vodozemcima Američkog društva za testiranje i materijale (ASTM) (16.).

Uvođenje kemikalije: priprema ispitnih otopina

19. Kako bi se pripremile ispitne otopine u sustavu izlaganja glavnu otopinu ispitivane kemikalije treba uvesti u sustav izlaganja odgovarajućom crpkom ili drugim uređajima. Brzinu protoka glavne otopine treba kalibrirati u skladu s analitičkom potvrdom ispitnih otopina prije početka izlaganja i tijekom ispitivanja periodično volumetrijski provjeravati. Ispitnu otopinu u svakoj komori treba obnavljati primjenom najmanje pet obnavljanja volumena dnevno.

20. Metoda koja se upotrebljava za uvođenje ispitivane kemikalije u sustav može varirati ovisno o njezinim fizikalno-kemijskim svojstvima. Stoga prije ispitivanja treba dobiti početne informacije o kemikaliji koje su relevantne za utvrđivanje mogućnosti njezina ispitivanja. Korisne informacije o svojstvima koja su specifična za ispitivanu kemikaliju uključuju strukturnu formulu, molekularnu masu, čistoću, stabilnost u vodi i na svjetlu, pK_a i K_{ow} , topljivost u vodi (po mogućnosti u ispitnom mediju) i tlak pare te rezultate ispitivanja lake biorazgradivosti (ispitna metoda C.4. (17.) ili C.29. (18.)). Topljivost i tlak pare mogu se upotrijebiti za izračunavanje konstante Henryjeva zakona, na temelju koje se može zaključiti mogu li se očekivati gubitci zbog isparavanja ispitivane kemikalije. Provedbu ovog ispitivanja bez prethodno navedenih informacija treba pažljivo razmotriti jer će plan studije ovisiti o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije i bez tih podataka rezultate ispitivanja možda će biti teško tumačiti ili neće imati smisla. Potrebna je pouzdana analitička metoda za kvantifikaciju ispitivane kemikalije u ispitnim otopinama s utvrđenom i dokumentiranom točnošću i granicom otkrivanja. Ispitivane kemikalije topljive u vodi mogu se otopiti u alikvotima vode za razrjeđivanje pri koncentraciji pri kojoj je moguća isporuka ciljane ispitivane koncentracije u protočnom sustavu. Za kemikalije koje su na sobnoj temperaturi u tekućem ili krutom stanju te su umjereno topljive u vodi možda će biti potrebno miješanje dviju tekućina do zasićenosti ili miješanje tekućine i krute tvari do zasićenosti (npr. kolona od staklene vune) (19.). Iako će možda biti moguće dozirati vrlo hidrofbne ispitivane kemikalije u hrani, zasada je iskustvo u upotrebi tog načina izlaganja u ovom testu ograničeno.
21. Ispitne otopine odabranih koncentracija pripremaju se razrjeđivanjem glavne otopine. Glavnu otopinu trebalo bi po mogućnosti pripremiti jednostavnim miješanjem ili mućkanjem ispitivane kemikalije u vodi za razrjeđivanje mehaničkim sredstvima (npr. miješanjem i/ili tretiranjem ultrazvukom). Za postizanje odgovarajuće koncentracije glavne otopine mogu se upotrebljavati kolone/sustavi za zasićivanje ili pasivne metode doziranja (20.). Prednost se daje upotrebi ispitnog sustava bez otapala; međutim, različite ispitivane kemikalije sadržavat će različita fizikalno-kemijska svojstva koja će vjerojatno zahtijevati različite pristupe za pripremu vode za izlaganje kemikaliji. Treba nastojati izbjeći otapala ili nosače jer: 1. određena otapala sama po sebi mogu dovesti do toksičnosti i/ili nepoželjnih ili neočekivanih odgovora; 2. ispitivanje kemikalija iznad njihove topljivosti u vodi (što se često javlja upotrebom otapala) može dovesti do pogrešnih utvrđivanja učinkovitih koncentracija; 3. upotreba otapala u dugoročnim ispitivanjima može dovesti do znatnog stupnja nastanka „biofilma” povezanog s djelovanjem mikroba, što može utjecati na okolišne uvjete te sposobnost održavanja koncentracija izlaganja i 4. ako ne postoje prijašnji podaci koji pokazuju da otapalo ne utječe na ishod studije, upotreba otapala zahtijeva tretiranje kontrola s otapalom, što ima znatne posljedice u pogledu dobrobiti životinja jer su potrebne dodatne životinje za provedbu ispitivanja. Za kemikalije koje se teško ispituju, otapalo se može upotrebljavati kao krajnje sredstvo i potrebno je proučiti Smjernicu OECD-a za ispitivanje toksičnosti teških tvari i smjesa u vodi (21.) kako bi se utvrdila najbolja metoda. Odabir otapala ovisit će o kemijskim svojstvima ispitivane kemikalije i dostupnosti prijašnjih kontrolnih podataka o otapalu. Ako ne postoje prijašnji podaci, prije provedbe konačne studije treba utvrditi primjerenost otapala. Ako se ne može izbjeći upotreba otapala i dođe do djelovanja mikroba (nastanak biofilma), preporučuje se evidentiranje/izvješćivanje o nastanku biofilma po spremniku (najmanje jednom tjedno) tijekom cijelog ispitivanja. U idealnim uvjetima koncentraciju otapala u kontroli s otapalom i svim ispitnim obradama trebalo bi održavati stalnom. Ako se koncentracija otapala ne održava stalnom, najvišu koncentraciju otapala u ispitnoj obradi treba upotrijebiti u kontroli s otapalom. U slučajevima u kojima se upotrebljava otapalo nosač najviše koncentracije otapala ne bi smjele biti veće od 100 μ l/l ili 100 mg/l (21.) i preporučuje se da se koncentracija otapala održava što nižom (npr. <20 μ l/l) kako bi se izbjegli mogući učinci otapala na krajnje točke koje se mjere (22.).

Ispitne životinje

Ispitne vrste

22. Kao ispitna vrsta upotrebljava se *X. laevis* iz sljedećih razloga: 1. rutinski se uzgaja u laboratorijima diljem svijeta; 2. može se lako nabaviti kod komercijalnih dobavljača i 3. moguće je utvrditi genetski spol.

Njega i uzgoj odraslih životinja

23. Primjerena njega i uzgoj vrste *X. laevis* opisani su u standardiziranoj smjernici (23.). Držanje i njegu vrste *X. laevis* opisao je i Read (24.). Kako bi se induciralo razmnožavanje, odraslim ženka i mužjacima koji čine od tri do pet parova intraperitonealno se ubrizgava humani korionski gonadotropin (hCG). Uzorcima ženki i mužjaka ubrizgava se npr. približno 800–1 000 IU odnosno 500–800 IU hCG-a otopljenog u fiziološkoj otopini od 0,6 do 0,9 % (ili Ringerovoj otopini za žabe, izotoničnoj otopini za upotrebu na vodozemcima). Volumeni koji se ubrizgavaju trebaju iznositi približno 10 μ l/g tjelesne mase (~ 1 000 μ l). Nakon toga inducirani uzgojni parovi drže se u velikim

spremnici, neometano i pod statičkim uvjetima radi poticanja amplexusa (vanjske oplodnje). Dno svakog spremnika za parenje trebalo bi imati lažno dno s mrežom od nehrđajućeg čelika (npr. otvori od 1,25 cm), koja omogućava da jajašca padnu na dno spremnika. Žabe kojima je hCG ubrizgan u kasnim poslijepodnevnim satima obično će položiti većinu svojih jajašaca do sredine jutra sljedećeg dana. Nakon izbacivanja i oplodnje dovoljne količine jajašaca potrebno je ukloniti odrasle životinje iz spremnika za uzgoj. Jajašca se zatim prikupljaju i želatinozni omotači uklanjaju se tretiranjem L-cisteinom (23.). Treba pripremiti 2-postotnu otopinu L-cisteina, a pH-vrijednost prilagoditi na 8,1 s 1 M NaOH. Ta otopina temperature od 21 °C dodaje se u Erlenmeyerovu tikvicu od 500 ml koja sadržava jajašca iz jednog mrijesta te se lagano miješa jednu minutu ili dvije minute, a zatim temeljito ispire 6–8 puta vodom za uzgoj kulture temperature od 21 °C. Jajašca se zatim prenose u posude za kristalizaciju i utvrđuje se je li vijabilnost > 70 %, s minimalnim abnormalnostima kod embrija koji pokazuju diobu stanica.

PLAN ISPITIVANJA

Ispitne koncentracije

24. Preporučuje se upotreba najmanje četiriju koncentracija kemikalija i odgovarajućih kontrola (uključujući kontrole s otapalom, ako su potrebne). Općenito se preporučuje razmak između koncentracija (interval) koji nije veći od 3,2.
25. Za potrebe ovog ispitivanja treba upotrebljavati rezultate iz postojećih studija na vodozemcima u mjeri u kojoj je to moguće kako bi se utvrdila najviša ispitna koncentracija i izbjegle koncentracije koje su očito toksične. Utvrđivanju te koncentracije mogu pridonijeti informacije iz, na primjer, kvantitativnih odnosa između strukture i aktivnosti, analogija i podaci iz postojećih studija s vodozemcima kao što su analiza metamorfoze vodozemaca, ispitna metoda C.38. (25.) i analiza teratogeneze embrija žabe – *Xenopus* (23.) i/ili ispitivanja na ribama kao što su ispitne metode C.48., C.41. i C.49. (26., 27. i 28.). Prije provedbe testa LAGDA može se provesti pokus za utvrđivanje raspona. Preporučuje se da se izlaganje za utvrđivanje raspona započne u roku od 24 sata od oplodnje i nastavi od sedam do 14 dana (po potrebi i dulje) te da se ispitne koncentracije utvrde tako da intervali između ispitnih koncentracija nisu veći od faktora 10. Rezultati pokusa za utvrđivanje raspona trebali bi služiti za utvrđivanje najviše ispitne koncentracije u testu LAGDA. Napominje se da se u slučajevima u kojima se mora upotrijebiti otapalo primjerenost otapala (tj. može li ono utjecati na ishod studije) može utvrditi kao dio studije za utvrđivanje raspona.

Ponavljanja unutar ispitnih skupina i kontrola

26. Treba upotrijebiti najmanje četiri spremnika s ponavljanjem po ispitnoj koncentraciji i najmanje osam ponavljanja za kontrole (i kontrole s otapalom ako su potrebne) (tj. broj ponavljanja u kontroli i kontroli s otapalom treba biti dvostruko veći od broja ponavljanja svake ispitne skupine kako bi se osigurala odgovarajuća statistička snaga). Svako ponavljanje treba sadržavati najviše 20 životinja. Minimalni broj životinja koje se tretiraju bio bi 15 (pet za uzorak u 62. stadiju NF-a i deset mladih životinja). Međutim, svakom se ponavljanju dodaju dodatne životinje kako bi se uzela u obzir mogućnost smrtnosti i održao kritični broj od 15 životinja.

POSTUPAK

Pregled testa

27. Test započinje tek omriješćenim embrijima (8.–10. stadij NF-a) i nastavlja se razvojem mladih životinja. Životinje se svakodnevno pregledavaju kako bi se uočila smrtnost i bilo kakav znak abnormalnog ponašanja. U 62. stadiju NF-a prikuplja se poduzorak ličinki (do pet životinja po ponavljanju) i ispituju se različite krajnje točke (tablica 1.). Nakon što sve životinje dosegnu 66. stadij NF-a, tj. kraj metamorfoze (ili nakon 70 dana od započinjanja testa, ovisno o tome što je kraće), provodi se nasumično izdvajanje (ali bez uzimanja poduzoraka) kako bi se smanjio broj životinja (deset po spremniku) (vidjeti stavak 43.), a preostale životinje nastavljaju se izlagati do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli. Na kraju ispitivanja (uzorkovanje mladih životinja) obavljaju se dodatna mjerenja (tablica 1.).

Uvjeti izloženosti

28. Potpuni sažetak ispitnih parametara dostupan je u Dodatku 3. Tijekom razdoblja izlaganja svakodnevno treba mjeriti otopljeni kisik, temperaturu i pH-vrijednost ispitnih otopina. Vodljivost, lužnatost i tvrdoća mjere se jednom mjesečno. Za temperaturu vode ispitnih otopina razlike između ponavljanja i između tretiranja (u jednom danu) ne bi trebale biti veće od 1,0 °C. Isto tako, za pH-vrijednost ispitnih otopina razlike između ponavljanja i između tretiranja ne bi trebale biti veće od 0,5.
29. Nepojedena hrana i otpad mogu se svakodnevno uklanjati iz spremnika za izlaganje s pomoću sifona, pri čemu treba paziti da se izbjegne unakrsna kontaminacija među spremnicima. Treba se paziti da se smanje stres i traume za životinje, osobito tijekom kretanja, čišćenja akvarija i rukovanja. Potrebno je izbjegavati stresne uvjete/aktivnosti kao što su glasna i/ili neprekidna buka, tapkanje po akvariju, vibracije u akvariju.

Trajanje izlaganja ispitivanoj kemikaliji

30. Izlaganje započinje s tek omriješenim embrijima (8.–10. stadij NF-a) i nastavlja se do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a (≤ 45 dana od početka testa) u kontrolnoj skupini. Test LAGDA obično traje 16 tjedana (najviše 17 tjedana).

Početak testa

31. Za roditeljske životinje koje su upotrebljavaju za početak testa prethodno se trebalo dokazati da daju potomke čiji se spol može genetski utvrditi (Dodatak 5.). Nakon mriješćenja odraslih životinja embriji se prikupljaju, tretiraju cisteinom kako bi se uklonio želatinozni omotač te se probiru u pogledu vijabilnosti (23.). Tretiranje cisteinom omogućuje da se embriji ne zalijepe za površinu dok se njima rukuje tijekom probira. Probir se obavlja disekcijskim mikroskopom tako da se neodrživi embriji uklone pipetom odgovarajuće veličine. Poželjno je da se za ispitivanje upotrijebi jedan mrijest čija je vijabilnost veća od 70 %. Embriji u 8.–10. stadiju NF-a nasumično se raspoređuju u spremnike za tretiranje izlaganjem koji sadržavaju odgovarajući volumen vode za razrjeđivanje sve dok svaki spremnik ne sadržava 20 embrija. Embrijima treba pažljivo rukovati tijekom ovog prijenosa kako bi se smanjio stres zbog rukovanja i kako bi se izbjegle ozljede. Punoglavci bi se trebali pomaknuti prema gore u vodenom stupcu i početi prianjati uz stijenke spremnika 96 sati nakon oplodnje.

Režim hranjenja

32. Promjena hrane i količine hrane tijekom različitih životnih faza vrste *X. laevis* vrlo su važan aspekt protokola za test LAGDA. Pretjerano hranjenje tijekom faze ličinki obično dovodi do učestalije pojave i težeg oblika skolioze (Dodatak 8.) te ga treba izbjegavati. Za razliku od toga, nedovoljno hranjenje tijekom faze ličinki dovodi do vrlo različitih stopa razvoja među kontrolama, što može ugroziti statističku snagu ili dovesti do zbunjujućih rezultata ispitivanja. U Dodatku 4. navodi se preporučena prehrana za ličinke i mlade životinje te režimi hranjenja za vrstu *X. laevis* u protočnim uvjetima, ali dopuštene su i alternative pod uvjetom da je osiguran pravilan rast i razvoj ispitnih organizama. Važno je napomenuti da ako se mjere krajnje točke koje su specifične za endokrini sustav, u hrani ne smije biti endokrinološki aktivnih tvari kao što je sojino brašno.

Hranjenje ličinki

33. Preporučena prehrana ličinki sastoji se od početne hrane za pastrve, tableta od algi *Spirulina* i pahuljica za zlatne ribice (npr. hrana u listićima TetraFin®, Tetra, Njemačka) pomiješanih u vodi za uzgoj kulture (ili za razrjeđivanje). Ta se smjesa primjenjuje tri puta dnevno radnim danom i jednom dnevno vikendom. Punoglavci se hrane i živim ličinkama račića *Artemia* spp. starima 24 sata dvaput dnevno radnim danom i jednom dnevno vikendom, počevši osmog dana nakon oplodnje. Hranjenje ličinki, koje treba biti dosljedno u svim ispitnim posudama, treba omogućiti primjereni rast i razvoj ispitnih životinja kako bi se osigurala obnovljivost i prenosivost rezultata testa: 1. srednje vrijeme do 62. stadija NF-a u kontrolama treba biti ≤ 45 dana i 2. preporučuje se srednja masa u rasponu od $1,0 \pm 0,2$ g u 62. stadiju NF-a u kontrolama.

Hranjenje mladih životinja

34. Kada metamorfoza završi režim hranjenja sastoji se od vrhunske hrane za žabe koja tone, npr. *Sinking Frog Food* -3/32 (Xenopus Express, FL, SAD) (Dodatak 4.). U ranoj fazi mladih žaba peleti se nakratko melju u mlinicu za kavu, miješalici ili se gnječe tarionikom i tučkom kako bi se usitnili. Kada mlade žabe narastu dovoljno da bi konzumirale cijele pelete mljevenje ili gnječenje više nije potrebno. Životinje treba hraniti jednom dnevno. Hranjenje mladih žaba treba omogućiti primjereni rast i razvoj organizama: preporučuje se srednja masa u rasponu od $11,5 \pm 3$ g kod kontrolnih mladih žaba na kraju testa.

Analitička kemija

35. Prije početka testa treba utvrditi stabilnost ispitivane kemikalije (npr. topljivost, razgradivost i hlapljivost) i sve potrebne analitičke metode, npr. upotrebom postojećih informacija ili znanja. Kod doziranja u vodi za razrjeđivanje preporučuje se da se ispitne otopine iz svakog spremnika s ponavljanjem analiziraju prije početka ispitivanja kako bi se provjerilo funkcioniranje sustava. Koncentracije ispitivane kemikalije utvrđuju se u primjerenim razmacima tijekom razdoblja izlaganja, po mogućnosti svakog tjedna za najmanje jedno ponavljanje u svakoj ispitnoj skupini, uz rotaciju ponavljanja iz iste ispitne skupine svakog tjedna. Preporučuje se da se rezultati temelje na izmjerenim koncentracijama. Međutim, ako je tijekom ispitivanja koncentracija ispitivane kemikalije u otopini uspješno održavana unutar 20 % nominalne koncentracije, rezultati se mogu temeljiti na nominalnim ili izmjerenim vrijednostima. Isto tako, koeficijent varijacije (CV) izmjerenih ispitnih koncentracija tijekom cijelog ispitnog razdoblja u tretiranju treba održavati na 20 % ili manje u svakoj koncentraciji. Ako izmjerene koncentracije ne ostanu u rasponu od 80 do 120 % nominalne koncentracije (na primjer, kod ispitivanja vrlo biorazgradivih ili adsorptivnih kemikalija), koncentracije s učinkom treba utvrditi i izraziti u odnosu na aritmetičku sredinu koncentracije za protočna ispitivanja.
36. Brzine protoka vode za razrjeđivanje i glavne otopine treba provjeravati u odgovarajućim intervalima (npr. tri puta tjedno) tijekom cijelog izlaganja. U slučaju kemikalija koje se ne mogu otkriti pri nekim ili svim nominalnim koncentracijama (npr. zbog brze razgradnje ili adsorpcije u ispitnim posudama ili vidne akumulacije kemikalije u tijelima izloženih životinja) preporučuje se da se stopa obnove ispitne otopine u svakoj komori prilagodi tako da se ispitne koncentracije održe što stabilnijima.

Opažanja i mjerenja krajnjih točaka

37. Tijekom izlaganja ocjenjuju se krajnje točke koje ukazuju na toksičnost, uključujući smrtnost, abnormalno ponašanje kao što su klinički znakovi bolesti i/ili opće toksičnosti te utvrđivanja rasta (duljine i mase) te patološke krajnje točke koje mogu reagirati i na opću toksičnost i na endokrine načine djelovanja koji su usmjereni na putove kojima posreduje estrogen, androgen ili hormon štitnjače. Osim toga, po želji se na kraju testa može izmjeriti i koncentracija VTG-a u plazmi. Mjerenje VTG-a može biti korisno u razumijevanju rezultata studije u kontekstu endokrinih mehanizama kemikalija za koje se sumnja da su endokrino disruptivne. Krajnje točke i vrijeme mjerenja sažeti su u tablici 1.

Tablica 1.

Pregled krajnjih točaka u ispitivanju LAGDA

Krajnje točke (*)	Svakodnevno	Uzorkovanje u međuvremenu (uzorkovanje ličinki)	Kraj ispitivanja (uzorkovanje mladih životinja)
Smrtnost i abnormalnosti	X		
Vrijeme do 62. stadija NF-a		X	
Histo(pato)logija (štitnjača)		X	
Morfometrija (rast u pogledu mase i duljine)		X	X
Somatski indeks jetre (LSI)			X
Omjeri genetskog/fenotipskog spola			X
Histopatologija (gonade, reproduktivni kanali, bubreg i jetra)			X
Vitelogenin (VTG) (neobavezno)			X

(*) Sve krajnje točke statistički se analiziraju.

Smrtnost i svakodnevna opažanja

38. Sve ispitne spremnike potrebno je provjeriti svakodnevno radi mrtvih životinja i zabilježiti smrtne slučajeve za svaki spremnik. Mrtve životinje potrebno je ukloniti iz ispitnog spremnika čim se uoče. Razvojni stadij uginulih životinja treba razvrstati kao životinje prije 58. stadija NF-a (prije pojave udova), od 58. stadija NF-a do 62. stadija NF-a, od 63. stadija NF-a do 66. stadija NF-a (od 62. stadija NF-a do potpune resorpcije repa) ili nakon 66. stadija NF-a (nakon faze ličinke). Stope smrtnosti veće od 20 % mogu ukazivati na neprimjerene ispitne uvjete ili očito toksične učinke ispitivane kemikalije. Životinje su obično najosjetljivije na događaje sa smrtnim ishodom koji nisu inducirani kemikalijama tijekom prvih par dana razvoja nakon mriješćenja i tijekom metamorfoznog klimaksa. Takva smrtnost mogla bi biti očita iz kontrolnih podataka.
39. Osim toga, treba evidentirati sva neobična ponašanja, jako izražene malformacije (npr. skoliozu) ili lezije. Treba prebrojati slučajeve opažene skolioze (učestalost) i razvrstati s obzirom na ozbiljnost (npr. nije značajna – NR, minimalna – 1, umjerena – 2, teška – 3; Dodatak 8.). Treba nastojati osigurati da se ograniči učestalost pojave umjerene i teške skolioze (npr. manja od 10 % u kontrolama) tijekom cijele studije, iako veća učestalost pojave abnormalnosti u kontrolama ne bi nužno bila razlog za prekid ispitivanja. Normalno ponašanje za ličinke karakterizira lebdenje u vodenom stupcu s repom povišenim iznad glave, redovito i ritmičko udaranje repne peraje, redovito izranjanje na površinu, operkulacija i reagiranje na podražaje. Neuobičajena ponašanja uključivala bi npr. plutanje na površini, ležanje na dnu spremnika, obrnuto ili nepravilno plivanje, neizlaženje na površinu i nereagiranje na poticaje. Uz prethodno navedena abnormalna ponašanja, za životinje nakon metamorfoze treba evidentirati i velike razlike u unosu hrane među tretiranjima. Grube malformacije i lezije mogu na primjer uključivati morfološke anomalije (npr. deformacije udova), hemoragijske lezije, abdominalne edeme te bakterijske ili gljivične infekcije. Pojave lezija na glavi mladih životinja, odmah iza nosnica, mogu biti znak nedovoljne vlažnosti. Ta su određivanja kvalitativna i potrebno ih je smatrati srodnim kliničkim znakovima bolesti/stresa i usporediti s kontrolnim životinjama. Ako je stopa učestalosti pojave veća u izloženim spremnicima nego u kontrolnima, tada ih je potrebno smatrati dokazom očite toksičnosti.

Poduzorkovanje ličinki

Okvir za poduzorkovanje ličinki

40. Punoglavce koji su dosegli 62. stadij NF-a treba ukloniti iz spremnika te uzorkovati ili prenijeti u sljedeći dio izlaganja u novom spremniku ili fizički odvojiti od preostalih punoglavaca u istom spremniku s pomoću pregrade. Punoglavci se svakodnevno pregledavaju i evidentira se dan studije na koji pojedinačni punoglavac dosegne 62. stadij NF-a. U ovoj se procjeni kao odlučujuća karakteristika upotrebljava oblik glave. Kada se glava smanji tako da je vizualno približno jednaka širini trupa i prednjih udova na razini sredine srca smatra se da je jedinka dosegla 62. stadij NF-a.
41. Cilj je uzorkovati ukupno pet punoglavaca u 62. stadiju NF-a po spremniku s ponavljanjem. To bi trebalo provesti potpuno nasumično, ali odluku treba donijeti *a priori*. Hipotetski primjer spremnika s ponavljanjem prikazan je na **slici 1**. Ako u određenom spremniku ima 20 živih punoglavaca kada prva jedinka dosegne 62. stadij NF-a, treba odabrati pet nasumičnih brojeva u rasponu 1–20. Punoglavac br. 1 prva je jedinka koja dosegne 62. stadij NF-a, a punoglavac br. 20 posljednja je jedinka u spremniku koja dosegne 62. stadij NF-a. Isto tako, ako u spremniku ima 18 živih ličinki, treba odabrati pet nasumičnih brojeva u rasponu 1–18. To treba obaviti za svaki spremnik s ponavljanjem kada prva jedinka u ispitivanju dosegne 62. stadij NF-a. Ako tijekom uzorkovanja u 62. stadiju NF-a postoje smrtni slučajevi, preostale uzorke treba ponovno nasumično odabrati na temelju broja preostalih ličinki koje nisu dosegnule 62. stadij NF-a i koliko je uzoraka još potrebno kako bi se dobilo ukupno pet uzoraka iz tog ponavljanja. Na dan na koji punoglavac dosegne 62. stadij NF-a, upućuje se na pripremljenu shemu uzorkovanja kako bi se utvrdilo hoće li se ta jedinka uzorkovati ili fizički odvojiti od ostalih punoglavaca radi daljnjeg izlaganja. U navedenom primjeru (slika 1.) prva jedinka koja je dosegla 62. stadij NF-a (tj. okvir br. 1) fizički je odvojena od ostalih ličinki i nastavlja se izlagati te se evidentira dan studije na koji je jedinka dosegla 62. stadij NF-a. Nakon toga jedinke br. 2 i 3 tretiraju se na isti način kao i jedinka br. 1 i zatim se jedinka br. 4 uzorkuje za rast i histologiju štitnjače (prema ovom primjeru). Taj se postupak nastavlja dok se 20. jedinka ne pridruži ostalim jedinkama nakon 62. stadija NF-a ili se uzorkuje. Upotrijebljeni postupak nasumičnog odabira mora pružiti svakom organizmu u ispitivanju jednaku vjerojatnost da bude izabran. To se može postići primjenom bilo koje metode nasumičnog odabira, ali potrebno je da svaki punoglavac bude umrežen u nekom trenutku tijekom razdoblja poduzorkovanja u 62. stadiju NF-a.

Slika 1.

Hipotetički primjer režima uzorkovanja u 62. stadiju NF-a za jedan spremnik s ponavljanjem

Vrijeme

Jedan spremnik s ponavljanjem – bez smrtnosti

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----



Pojedinačna ličinka



Poduzorak

42. Za poduzorkovanje ličinki dobivaju se sljedeće krajnje točke: 1. vrijeme do 62. stadija NF-a (tj. broj dana od oplodnje do 62. stadija NF-a); 2. vanjske abnormalnosti; 3. morfometrijski podaci (npr. masa i duljina) te 4. histologija štitnjače.

Humano usmrćivanje punoglavaca

43. Poduzorak punoglavaca u 62. stadiju NF-a (pet jedinki po ponavljanju) treba eutanazirati uranjanjem u odgovarajuću količinu (npr. 500 ml) otopine anestetika (npr. 0,3-postotnu otopinu MS-222, trikain-metansulfonata, CAS.886-86-2) u trajanju od 30 minuta. Otopinu MS-222 treba puferirati natrijevim bikarbonatom kako bi se postigla pH-vrijednost od približno 7,0 jer je nepuferirana otopina MS-222 kisela i nadražuje kožu žabe, što dovodi do slabe apsorpcije i nepotrebnog dodatnog stresa za organizam.
44. Punoglavac se s pomoću mrežice uklanja iz ispitne komore i prenosi (stavlja) u otopinu za eutanaziju. Životinja se pravilno eutanazira i spremna je za nekropsiju kada ne reagira na vanjske podražaje kao što je štipanje stražnjeg uda pincetom.

Morfometrija (masa i duljina)

45. Mjerenje mokre mase (najbliži miligram) i duljine od vrha njuške do kloake (SVL, engl. *snout-to-vent length*) (najbližih 0,1 mm) svakog punoglavca treba obaviti odmah nakon što prestane reagirati zbog djelovanja anestezije (slika 2.a). Za mjerenje SVL-a s fotografije može se upotrijebiti softver za analizu slike. Punoglavce prije vaganja treba osušiti upijajućim materijalom kako bi se uklonio višak vode. Nakon mjerenja veličine tijela (masa i SVL) treba evidentirati ili zabilježiti sve makromorfološke abnormalnosti i/ili kliničke znakove toksičnosti kao što su skolioza (vidjeti Dodatak 8.), petehije i krvarenje te se preporučuje digitalno dokumentiranje. Napominje se da su petehije mala crvena ili ljubičasta krvarenja kapilara kože.

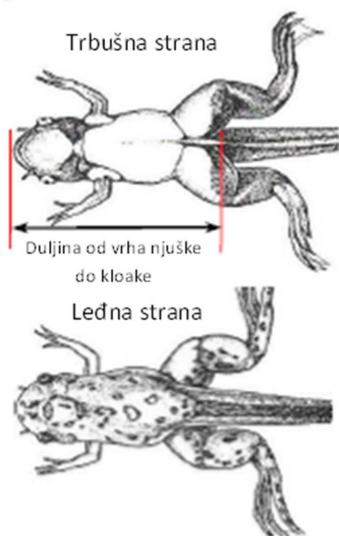
Prikupljanje i fiksiranje tkiva

46. Za poduzorak ličinki štitnjače se histološki procjenjuju. Donji dio trupa iza prednjih udova uklanja se i odbacuje. Odrezano truplo fiksira se u Davidsonovu fiksativu. Volumen fiksativa u spremniku treba biti barem deset puta veći od odgovarajućeg volumena tkiva. Treba postići primjereno protresanje ili cirkulaciju fiksativa kako bi se primjereno fiksirala tkiva od interesa. Sva tkiva ostaju u Davidsonovu fiksativu najmanje 48 sati, ali ne dulje od 96 sati, kada se ispiru deioniziranom vodom i pohranjuju u 10-postotnom neutralno puferiranom formalinu (1. i 29.).

Histologija štitnjače

47. Svaki poduzorak ličinki (fiksirana tkiva) histološki se procjenjuje u pogledu štitnjače, tj. utvrđuju se dijagnoza i ocjena ozbiljnosti (29. i 30.).

a. Poduzorkovanje ličinki (62. stadij NF-a)



b. Uzorkovanje mladih životinja



Slika 2.: Oznake za mjerenje duljine od vrha njuške do kloake u testu LAGDA u 62. stadiju NF-a (a) i u mladim žaba (b). Odlučujuće karakteristike 62. stadija NF-a (a): glava je jednako široka kao i trup, duljina olfaktornog živca manja je od promjera olfaktornog bulbusa (pogled s leđne strane), a prednji udovi u razini su srca (pogled s trbušne strane). Slike prilagođene iz Nieuwkoop i Faber (1994.).

Kraj izlaganja ličinki

48. S obzirom na početni broj punoglavaca, očekuje se da će vjerojatno doći do malog postotka jedinki koje se nisu normalno razvile i koje neće dovršiti metamorfozu (66. stadij NF-a) u razumnom roku. Dio izlaganja s ličinkama ne bi trebao biti dulji od 70 dana. Sve punoglavce koji preostanu na kraju tog razdoblja treba eutanazirati (vidjeti stavak 43.), izmjeriti njihovu mokru masu i SVL, odrediti njihov stadij prema Nieuwkoopu i Faberu, 1994., i zabilježiti sve razvojne abnormalnosti.

Izdvajanje nakon 66. stadija NF-a

49. Nakon 66. stadija NF-a (potpuna resorpcija repa) treba zadržati deset jedinki po spremniku do kraja izlaganja. Stoga treba obaviti izdvajanje nakon što sve životinje dosegnu 66. stadij NF-a ili nakon 70 dana (ovisno o tome što nastupi ranije). Životinje koje su prošle 66. stadij NF-a koje se neće nastaviti izlagati treba nasumično odabrati.
50. Životinje koje se ne odaberu za nastavak izlaganja eutanaziraju se (vidjeti stavak 43.). Za svaku se životinju provode mjerenja razvojnog stadija, mokre mase i SVL-a (slika 2.b) te makroskopska nekropsija. Fenotipski spol (na temelju morfologije gonada) bilježi se kao ženski, muški ili neodređen.

Uzorkovanje mladih životinja*Okvir za uzorkovanje mladih životinja*

51. Preostale životinje nastavljaju se izlagati do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontroli s vodom za razrjeđivanje (i/ili kontroli s otapalom ako je relevantno). Na kraju razdoblja izlaganja preostale se životinje (najviše deset žaba po ponavljanju) eutanaziraju i mjere se različite krajnje točke ili se ocjenjuju i evidentiraju: 1. morfometrijski podaci (masa i duljina); 2. omjeri fenotipskog/genotipskog spola; 3. masa jetre (somatski indeks jetre); 4. histopatologija (gonade, reproduktivni kanali, jetra i bubreg) te po želji 5. VTG u plazmi.

Humano usmrćivanje žaba

52. Uzorci mladih životinja, žabe nakon metamorfoze, eutanaziraju se intraperitonealnom injekcijom anestetika, npr. 10-postotnim MS-222 u odgovarajućoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom. Žabe se mogu uzorkovati nakon što prestanu reagirati (obično dvije minute nakon injekcije ako se upotrebljava 10-postotni MS-222 u dozi od 0,01 ml po gramu žabe). Iako bi se mlade žabe mogle uroniti u anestetik više koncentracije (MS-222), iz iskustva je poznato da je potrebno više vremena da se anestetiziraju tom metodom i to trajanje možda nije primjereno za omogućivanje uzorkovanja. Injekcija pruža učinkovitu i brzu eutanaziju prije uzorkovanja. Uzorkovanje ne treba započinjati dok se ne potvrdi da žabe ne reagiraju kako bi se osiguralo da su životinje mrtve. Ako žabe pokazuju znakove znatne patnje (vrlo teška patnja i smrt mogu se pouzdano predvidjeti) te se smatra da su na umoru, životinje treba anestetizirati i eutanazirati, a u analizi podataka ih tretirati kao smrtnost. Ako se žaba eutanazira zbog morbiditeta, to treba evidentirati i treba izvijestiti o tome. Žaba se može zadržati radi provedbe histopatološke analize ovisno o tome u kojoj se fazi studije eutanazira (fiksiranje žabe za moguću histopatološku analizu).

Morfometrija (masa i duljina)

53. Mjerenja mokre mase i SVL-a (slika 2.b) ista su kao i ona opisana za poduzorkovanje ličinki.

VTG u plazmi (neobavezno)

54. VTG je naširoko prihvaćeni biomarker koji je posljedica izlaganja estrogenim kemikalijama. U testu LAGDA VTG u plazmi može se po želji mjeriti u uzorcima mladih životinja (to može biti osobito relevantno ako se sumnja da je ispitivana kemikalija estrogen).
55. Režu se stražnji udovi eutanaziranih mladih životinja i uzima se krv s pomoću heparinizirane kapilare (iako mogu biti primjerene i druge metode uzimanja krvi, kao što je punkcija srca). Krv se stavlja u epruvetu za mikrocentrifugu (npr. volumena od 1,5 ml) i centrifugira kako bi se dobila plazma. Uzorke plazme treba pohraniti na temperaturi od – 70 °C ili nižoj do utvrđivanja VTG-a. Koncentracija VTG-a u plazmi može se izmjeriti metodom imunoenzimskog testa (ELISA) (Dodatak 6.) ili drugom metodom kao što je masena spektrometrija (31.). Prednost se daje protutijelima specifičnima za vrstu zbog veće osjetljivosti.

Određivanje genetskog spola

56. Genetski spol svake mlade žabe ocjenjuje se na temelju markera koje su razvili Yoshimoto i dr.(11.). Kako bi se utvrdio genetski spol, dio jednog stražnjeg uda ili cijeli ud (ili bilo koje drugo tkivo) koji je uklonjen tijekom seciranja prikuplja se i pohranjuje u epruveti za mikrocentrifugu (uzorci tkiva žaba mogu se dobiti iz bilo kojeg tkiva). Tkivo se može pohraniti na temperaturi od -20°C ili nižoj do izoliranja deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Izoliranje DNK-a iz tkiva može se obaviti komercijalno dostupnim priborom za ispitivanje, a analiza u kojoj se utvrđuje prisustvo ili odsustvo markera obavlja se primjenom metode lančane reakcije polimerazom (PCR) (Dodatak 5.). Usklađenost histološkog spola i genotipa kod kontrolnih životinja u trenutku uzorkovanja mladih životinja u kontrolnim skupinama općenito je veća od 95 %.

Prikupljanje i fiksiranje tkiva za histopatologiju

57. Tijekom konačnog uzorkovanja prikupljaju se gonade, reproduktivni kanali, jetra i bubrezi radi histološke analize. Otvara se trbušna šupljina te se disecira i važe jetra. Zatim se probavni organi (npr. želudac, crijeva) pažljivo uklanjaju iz donjeg abdomena kako bi se otkrile gonade, bubrezi i reproduktivni kanali. Treba zabilježiti sve morfološke abnormalnosti gonada. Naposljetku, treba ukloniti stražnje udove ako već nisu prethodno uklonjeni radi uzimanja krvi. Prikupljene jetre i truplo u kojem su gonade ostavljene *in situ* treba odmah staviti u Davidsonov fiksativ. Volumen fiksativa u spremniku treba biti barem deset puta veći od odgovarajućeg volumena tkiva. Sva tkiva ostaju u Davidsonovu fiksativu najmanje 48 sati, ali ne dulje od 96 sati, kada se ispiru deioniziranom vodom i pohranjuju u 10-postotnom neutralnom puferiranom formalinu (1. i 29.).

Histopatologija

58. Svaki uzorak mladih životinja histološki se ocjenjuje u pogledu patologije u tkivu gonada, reproduktivnih kanala, bubrega i jetre, tj. daje se dijagnoza i ocjena ozbiljnosti (32.). Iz te se ocjene izvodi i fenotip gonada (npr. jajnici, testisi, interseksualne) i, zajedno s pojedinačnim mjerenjima genetskog spola, ta se opažanja mogu upotrijebiti za izračun omjera fenotipskog/genotipskog spola.

PODACI I IZVJEŠĆIVANJE

Statistička analiza

59. U testu LAGDA nastaju tri oblika podataka koji se statistički analiziraju: 1. kvantitativni kontinuirani podaci (masa, SVL, LSI, VTG); 2. podaci o vremenu do određenog događaja za stope razvoja (tj. dani od početka testa do 62. stadija NF-a) i 3. ordinalni podaci u obliku ocjena ozbiljnosti ili razvojnih stadija iz histopatoloških ocjena.
60. Preporučuje se da plan ispitivanja i odabir statističkog testa omoguće odgovarajuću snagu za otkrivanje promjena od biološke važnosti na krajnjim točkama na kojima se izvješćuje o vrijednosti NOEC ili ECx. Statističke analize podataka (općenito na temelju srednje vrijednosti ponavljanja) trebale bi po mogućnosti poštovati postupke opisane u dokumentu Sadašnji pristupi u statističkoj analizi podataka o ekotoksičnosti: Smjernice za primjenu (33.). U Dodatku 7. ovoj ispitnoj metodi navedeni su shema odlučivanja preporučene statističke analize i smjernice za obradu podataka i odabir najprimjerenijeg statističkog testa ili modela za upotrebu u testu LAGDA.
61. Podatke iz uzorkovanja mladih životinja (npr. rast, LSI) treba analizirati zasebno za svaki genotipski spol jer se genotipski spol utvrđuje za sve žabe.

Razmatranja o analizi podataka

Upotreba kompromitiranih ponavljanja i tretiranja

62. Ponavljanja mogu postati kompromitirana zbog prevelike smrtnosti uzrokovane očitom toksičnošću, bolešću ili tehničkom pogreškom. Ako je tretiranje kompromitirano zbog bolesti ili tehničke pogreške, za analizu trebaju biti dostupna tri nekompromitirana tretiranja s tri nekompromitirana ponavljanja. Ako u tretiranjima s visokim koncentracijama dođe do očite toksičnosti, poželjno je da za analizu budu dostupne najmanje tri razine tretiranja s tri nekompromitirana ponavljanja (u skladu s pristupom najviše prihvatljive koncentracije za smjernice OECD-a za ispitivanje (34)). Uz smrtnost, znakovi očite toksičnosti mogu uključivati učinke na ponašanje (npr. plutanje na površini, ležanje na dnu spremnika, obrnuto ili nepravilno plivanje, neizlaženje na površinu), morfološke lezije (npr. hemoragijske lezije, abdominalne edeme) ili inhibiciju normalnih odgovora na hranjenje u kvalitativnoj usporedbi s kontrolnim životinjama.

Kontrola s otapalom

63. Na kraju ispitivanja treba procijeniti moguće utjecaje otapala (ako se upotrebljava). To se radi statističkom usporedbom kontrolne skupine s otapalom i kontrolne skupine s vodom za razrjeđivanje. Najrelevantnije krajnje točke koje treba razmotriti u toj analizi determinante su rasta (masa i duljina) jer na njih mogu utjecati opće toksičnosti. Ako se na tim krajnjim točkama otkriju znatne razlike između kontrolnih skupina s vodom za razrjeđivanje i s otapalom, treba primijeniti stručnu prosudbu kako bi se utvrdilo je li narušena valjanost ispitivanja. Ako se dvije kontrole razlikuju, tretiranja izložena kemikaliji treba usporediti s kontrolom s otapalom osim ako je poznato da se prednost daje kontroli s vodom za razrjeđivanje. Ako nema statistički značajne razlike između dviju kontrolnih skupina, preporučuje se da se tretiranja izložena ispitivanoj kemikaliji usporede s objedinjenim kontrolama (kontrolne skupine s otapalom i s vodom za razrjeđivanje), osim ako je poznato da se prednost daje samo kontroli s vodom za razrjeđivanje ili kontroli s otapalom.

Izvješće o ispitivanju

64. Izvješće o ispitivanju trebalo bi sadržavati sljedeće informacije:

Ispitivana kemikalija:

— fizikalno stanje i po potrebi fizikalno-kemijska svojstva,

— Tvar s jednim sastojkom:

fizički izgled, topljivost u vodi i druga relevantna fizikalno-kemijska svojstva,

kemijske identifikacijske oznake, kao što su IUPAC ili CAS naziv, CAS broj, SMILES ili InChI oznaka, strukturna formula, čistoća, kemijski identitet nečistoća prema potrebi i ako je izvedivo u praksi itd. (uključujući udio organskog ugljika, prema potrebi).

— Tvar s više sastojaka, UVCB tvari i smjese:

opis (koliko je to moguće) kemijskog identiteta (vidjeti gore), kvantitativnog udjela i relevantnih fizikalno-kemijskih svojstava sastojaka.

Ispitne vrste:

— znanstveni naziv, soj ako je dostupno, podrijetlo, metoda sakupljanja oplođenih jajašaca i kasnije postupanje,

— učestalost pojave skolioze u prijašnjim kontrolama za matičnu kulturu koja se upotrebljava.

Ispitni uvjeti:

— fotoperiodi,

— plan ispitivanja (npr. veličina komore, materijal i volumen vode, broj ispitnih komora i ponavljanja, broj ispitnih organizama po ponavljanju),

— način pripreme glavnih otopina i učestalost obnavljanja (ako se koristi sredstvo za otapanje, trebalo bi ga navesti zajedno s koncentracijom),

— metoda doziranja ispitivane kemikalije (npr. crpkama, sustavima za razrjeđivanje),

— iskoristivost metode i nazivnih ispitnih koncentracija, granica kvantifikacije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije u ispitnim posudama te metoda kojom su one dobivene i dokazi da se izmjerene vrijednosti odnose na koncentracije ispitivane kemikalije u stvarnoj otopini,

— svojstva vode za razrjeđivanje: pH, tvrdoća, temperatura, koncentracija otopljenog kisika, rezidualni klor (ako se mjeri), ukupni jod, ukupni organski ugljik (ako se mjeri), suspendirana kruta tvar (ako se mjeri), salinitet ispitnog medija (ako se mjeri) i ostala provedena mjerenja,

- nazivne ispitne koncentracije, srednje izmjerene vrijednosti i njihove standardne devijacije,
- kakvoća vode u ispitnim posudama, pH, temperatura (dnevno) i koncentracija otopljenog kisika,
- detaljne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, izvor, količina hrane i učestalost hranjenja).

Rezultati:

- dokazi o usklađenosti kontrola s kriterijima valjanosti,
 - sljedeći podaci za kontrolu (i kontrolu s otapalom ako se koristi) i ispitne skupine: uočena smrtnost i abnormalnosti, vrijeme do 62. stadija NF-a, histološka procjena štitnjače (samo kod uzorka ličinki), rast (masa i duljina), LSI (samo kod uzorka mladih životinja), omjeri genetskog/fenotipskog spola (samo kod uzorka mladih životinja), rezultati histopatološke procjene za gonade, reproduktivne kanale, bubrege i jetru (samo kod uzorka mladih životinja) te VTG u plazmi (samo kod uzorka mladih životinja ako se provodi),
 - pristup za statističku analizu i obradu podataka (primijenjeni statistički test ili model),
 - najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC) za svaki ocijenjeni odgovor,
 - najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC) za svaki ocijenjeni odgovor (pri $\alpha = 0,05$); ECx za svaki ocijenjeni odgovor, ako je primjenjivo, te intervali pouzdanosti (npr. 95 %) i graf prilagođenog modela primijenjenog za izračun vrijednosti ECx, nagib krivulje koncentracija – odgovor, formula regresijskog modela, procijenjeni parametri modela i njihove standardne pogreške,
 - sva odstupanja od ispitne metode i odstupanja od kriterija prihvatljivosti te razmatranja potencijalnih posljedica na ishod ispitivanja.
65. Za rezultate mjerenja krajnjih točaka treba prikazati srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije (ako je moguće, i na temelju ponavljanja i koncentracija).
66. Srednje vrijeme do 62. stadija NF-a u kontrolama treba izračunati i prikazati kao srednju vrijednost medijana ponavljanja i njihovu standardnu devijaciju. Isto tako, za tretiranja treba izračunati medijan tretiranja i prikazati ga kao srednju vrijednost medijana ponavljanja i njihovu standardnu devijaciju.

LITERATURA

1. U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
2. OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.

3. Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, SAD.
4. Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. *Journal of Chromatography A* 1130: 16.–27.
5. Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Journal of the Royal Society of Medicine* 93: 140.–144.
6. Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 237: 1565.
7. Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. *International Journal of Developmental Biology* 34: 281.–285.
8. Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Zoological Science* 16: 335.–340.
9. Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. *Genetics* 48: 1411.
10. Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. *Aquatic Toxicology* 91: 143.–150.
11. Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2469.–2474.
12. Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117.–123.
13. Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. *Journal of Neurobiology* 37: 441.–448.
14. Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. *Aquatic Toxicology* 84: 321.–327.

15. Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-Tert-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. *Aquatic Toxicology* 103: 159.–169.
16. ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, SAD.
17. Poglavlje C.4. ovog Priloga, Određivanje „lake” biorazgradivosti.
18. Poglavlje C.29. ovog Priloga, Laka biorazgradivost CO₂ u zabrtvljenim posudama (test plinskog prostora).
19. Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. *Chemosphere* 39: 539.–551.
20. Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. *Chemosphere*, 86(6): 593.–9.
21. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
22. Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69.–92.
23. ASTM (2004.). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 – 98, Philadelphia, PA, SAD.
24. Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84. str.
25. Poglavlje C.38. ovog Priloga, Analiza metamorfoze vodozemaca.
26. Poglavlje C.48. ovog Priloga, Kratkoročni reproduksijski test na ribama.

27. Poglavlje C.41. ovog Priloga, Ispitivanje spolnog razvoja riba.
28. Poglavlje C.49. ovog Priloga, Ispitivanje akutne toksičnosti na ribljim embrijima.
29. OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
30. Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415.–424.
31. Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.
32. OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
33. OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organizacija za gospodarsku suradnju i razvoj, Pariz.
34. Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197.–202.

Dodatak 1.

DEFINICIJE

Apikalna krajnja točka: uzrokuje učinke na razini populacije.

Kemikalija: tvar ili smjesa.

ELISA: imunoenzimski test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

EC_x: (koncentracija s x-postotnim učinkom) koncentracija je koja u određenom razdoblju izlaganja izaziva x-postotni učinak na ispitne organizme u usporedbi s kontrolom. Na primjer, EC₅₀ je koncentracija za koju se procjenjuje da stvara učinak na krajnju točku ispitivanja u 50 % izložene populacije tijekom određenog razdoblja izlaganja.

dpf: dana nakon oplodnje.

Protočno ispitivanje: ispitivanje sa stalnim protokom ispitne otopine kroz ispitni sustav za vrijeme izlaganja.

Os HPG: os hipotalamus-hipofiza-gonade.

IUPAC: Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju.

Najniža koncentracija s vidljivim učinkom (LOEC): najniža je ispitana koncentracija ispitivane kemikalije kod koje je uočen statistički značajan učinak kemikalije (pri $p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom. Međutim, sve ispitne koncentracije iznad LOEC-a trebale bi imati jednak ili veći štetan učinak od onoga koji je uočen pri LOEC-u. Ako se ne mogu ispuniti ta dva uvjeta, trebalo bi navesti posebno objašnjenje za odabir LOEC-a (a time i NOEC-a). Smjernice se nalaze u dodatku 7.

Medijan smrtonosne koncentracije (LC₅₀): koncentracija ispitivane kemikalije koja je procijenjena kao smrtonosna za 50 % ispitnih organizama za vrijeme ispitivanja.

Najviša koncentracija bez vidljivog učinka (NOEC): ispitna je koncentracija neposredno ispod LOEC-a koja unutar navedenog razdoblja izlaganja nema statistički značajan učinak ($p < 0,05$) u usporedbi s kontrolom.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Ispitivana kemikalija: svaka tvar ili smjesa koja se ispituje ovom ispitnom metodom.

UVCB: tvari nepoznatog ili promjenjivog sastava, složeni reakcijski proizvodi ili biološki materijali.

VTG: vitelogenin je fosfolipoglikoproteinski prekursor proteina žumanjka koji je u pravilu prisutan u spolno aktivnih ženki svih vrsta koje liježu jaja.

Dodatak 2.

NEKA KEMIJSKA SVOJSTVA PRIHVATLJIVE VODE ZA RAZRJEĐIVANJE

Tvar	Granična koncentracija
Lebdeće čestice	5 mg/l
Ukupni organski ugljik	2 mg/l
Neionizirani amonijak	1 µg/l
Rezidualni klor	10 µg/l
Ukupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
Ukupni organoklorni pesticidi plus poliklorirani bifenili	50 ng/l
Ukupni organski klor	25 ng/l
Aluminij	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Krom	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Bakar	1 µg/l
Željezo	1 µg/l
Olovo	1 µg/l
Nikal	1 µg/l
Cink	1 µg/l
Kadmij	100 ng/l
Živa	100 ng/l
Srebro	100 ng/l

Dodatak 3.

ISPITNI UVJETI ZA TEST LAGDA

- | | |
|--|--|
| 1. Ispitna vrsta | <i>Xenopus laevis</i> |
| 2. Vrsta ispitivanja | Kontinuirano protočno |
| 3. Temperatura vode | Nominalna temperatura iznosi 21 °C. Srednja temperatura tijekom ispitivanja iznosi 21 ± 1 °C (razlike između ponavljanja i između tretiranja ne bi trebale biti veće od 1,0 °C). |
| 4. Kvaliteta osvjetljenja | Fluorescentne žarulje (široki spektar i) od 600 do 2 000 lux (lumens/m ²) na površini vode |
| 5. Fotoperiod | 12 sati svjetla, 12 sati tame |
| 6. Volumen ispitne otopine i ispitna posuda (spremnik) | 4–10 l (najmanja dubina vode od 10 do 15 cm)
Spremnik od stakla ili nehrđajućeg čelika |
| 7. Izmjene volumena ispitnih otopina | Konstantne, uzimajući u obzir i održavanje bioloških uvjeta i izlaganje kemikalijama (npr. pet obnavljanja volumena spremnika dnevno) |
| 8. Starost ispitnih organizama na početku | 8.–10. stadij prema Nieuwkoopu i Faberu (NF) |
| 9. Broj organizama po ponavljanju | 20 životinja (embrija) po spremniku (ponavljanju) na početku izlaganja i deset životinja (mladih životinja) po spremniku (ponavljanju) nakon 66. stadija NF-a do kraja izlaganja |
| 10. Broj tretiranja | Najmanje četiri tretiranja ispitivanom kemikalijom i odgovarajuće kontrole |
| 11. Broj ponavljanja po tretiranju | Četiri ponavljanja po tretiranju za ispitivanu kemikaliju i osam ponavljanja za kontrole |
| 12. Broj organizama po ispitnoj koncentraciji | Najmanje 80 životinja po tretiranju za ispitivanu kemikaliju i najmanje 160 životinja za kontrole |
| 13. Voda za razrjeđivanje | Bilo koja voda koja omogućuje normalan rast i razvoj vrste <i>X. laevis</i> (npr. izvorska voda ili voda iz slavine filtrirana ugljenom) |
| 14. Dozračivanje | Nije potrebno, ali dozračivanje spremnika može biti potrebno ako razina otopljenog kisika padne ispod preporučenih granica i maksimalno se poveća protok ispitne otopine. |
| 15. Otopljeni kisik ispitne otopine | Otopljeni kisik: ≥ 40 % vrijednosti zasićenosti kisikom ili $\geq 3,5$ mg/l |

- | | |
|--|---|
| 16. pH ispitne otopine | 6,5–8,5 (razlike između ponavljanja/između tretiranja ne smiju biti veće od 0,5) |
| 17. Tvrdća i lužnatost ispitne otopine | 10–250 mg CaCO ₃ /l |
| 18. Režim hranjenja | (Vidjeti Dodatak 4.) |
| 19. Razdoblje izlaganja | Od 8.–10. stadija NF-a do deset tjedana nakon srednjeg vremena do 62. stadija NF-a u kontrolnoj skupini s vodom i/ili otapalom (najviše 17 tjedana) |
| 20. Biološke krajnje točke | Smrtnost (i abnormalne pojave), vrijeme do 62. stadija NF-a (uzorak ličinki), histološka procjena štitnjače (uzorak ličinki), rast (masa i duljina), somatski indeks jetre (uzorak mladih životinja), omjeri genetskog/fenotipskog spola (uzorak mladih životinja), histopatologija za gonade, reproduktivne kanale, bubreg i jetru (uzorak mladih životinja) te vitelogenin u plazmi (uzorak mladih životinja, neobavezno) |
| 21. Kriteriji valjanosti ispitivanja | Otopljeni kisik trebao bi biti > 40 % vrijednosti zasićenosti kisikom; srednja temperatura vode treba biti u rasponu od 21 ± 1 °C i razlike između ponavljanja i između tretiranja trebale bi biti < 1,0 °C; pH ispitne otopine treba biti u rasponu od 6,5 do 8,5; smrtnost u kontrolama treba biti ≤ 20 % u svakom ponavljanju i srednje vrijeme do 62. stadija NF-a u kontroli treba biti ≤ 45 dana; srednja masa ispitnih organizama u 62. stadiju NF-a i na kraju testa treba dosegnuti 1,0 ± 0,2 g u kontrolama i 11,5 ± 3 g u kontrolama s otapalom (ako se upotrebljavaju); trebali bi postojati dokazi da su se koncentracije ispitivane kemikalije u otopini uspješno održavale u rasponu od ±20 % srednjih izmjerenih vrijednosti. |

Dodatak 4.

REŽIM HRANJENJA

Treba napomenuti da, iako se preporučuje upotreba ovog režima hranjenja, dopuštene su i alternative pod uvjetom da ispitni organizmi rastu i razvijaju se primjerenom brzinom.

Hranjenje ličinki*Priprema za prehranu ličinki*

A. 1: 1 (v/v) početna hrana za pastrve: alge/TetraFin® (ili ekvivalentno)

- Početna hrana za pastrve: miješati 50 g početne hrane za pastrve (fine granule ili prah) i 300 ml primjerene filtrirane vode 20 sekundi na visokoj postavci miješalice
- Smjesa alge/TetraFin® (ili ekvivalentno): miješati 12 g tableta od algi spirulina i 500 ml filtrirane vode na visokoj postavci miješalice 40 sekundi, miješati 12 g hrane Tetrafin® (ili ekvivalentno) s 500 ml filtrirane vode i zatim pomiješati te dvije smjese kako bi se dobila jedna litra smjese koja sadržava 12 g/l algi spirulina i 12 g/l hrane Tetrafin® (ili ekvivalentno)
- Kombinirati jednake volumene izmiješane početne hrane za pastrve i algi/hrane TetraFin® (ili ekvivalentno)

B. Račići Artemia

15 ml jajašaca račića Artemia vali se u 1 l slane vode (pripremljene dodavanjem 20 ml NaCl jednoj litri deionizirane vode). Račići se prikupljaju nakon dozračivanja u trajanju od 24 sata na sobnoj temperaturi i uz stalnu izloženost svjetlosti. Račići se ostavljaju da se slegnu tijekom 30 minuta zaustavljanjem dozračivanja. Ciste koje isplivaju na površinu kanistra izlijevaju se i odbacuju te se račići lijevaju kroz odgovarajuće filtre tako da se dobije 30 ml s filtriranom vodom.

Protokol hranjenja

U tablici 1. nalazi se upućivanje na vrstu i količinu hrane koja se upotrebljava tijekom izlaganja u stadijima ličinke. Životinje treba hraniti tri puta dnevno od ponedjeljka do petka i jednom dnevno vikendom.

Tablica 1

Režim hranjenja ličinki *X. laevis* u protočnim uvjetima

Vrijeme (*) (nakon oplodnje)	Početna hrana za pastrve: alge/TetraFin® (ili ekvivalentno)		Račići Artemia	
	Radni dan (3 puta dnevno)	Vikend (jednom dnevno)	Radni dan (dvaput dnevno)	Vikend (jednom dnevno)
Dani 4.–14. (u tjednima 0.–1.)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (od 8. do 15. dana) 1 ml (od 16. dana)	0,5 ml (od 8. do 15. dana) 1 ml (od 16. dana)
Drugi tjedan	0,67 ml	2,4 ml		
Treći tjedan	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Četvrti tjedan	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

Vrijeme (*) (nakon oplodnje)	Početna hrana za pastrve: alge/TetraFin® (ili ekvivalentno)		Račići Artemia	
	Radni dan (3 puta dnevno)	Vikend (jednom dnevno)	Radni dan (dvaput dnevno)	Vikend (jednom dnevno)
Peti tjedan	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Šesti tjedan	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Sedmi tjedan	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Tjedni 8.–10.	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Nulti dan definira se kao dan ubrizgavanja hCG-a.

Prelazak s prehrane za ličinke na prehranu za mlade životinje

Kako se završava metamorfoza ličinki, prelazi se na formulaciju prehrane za mlade životinje koja je objašnjena u nastavku. Tijekom tog prelaska treba se smanjivati hrana za ličinke i povećavati hrana za mlade životinje. To se može postići proporcionalnim smanjivanjem hrane za ličinke i proporcionalnim povećavanjem hrane za mlade životinje kako svaka skupina od pet punoglavaca prelazi 62. stadij NF-a i približava se dovršetku metamorfoze u 66. stadiju NF-a.

Hranjenje mladih životinja

Prehrana mladih životinja

Kada metamorfoza završi (66. stadij) režim hranjenja mijenja se tako da se upotrebljava samo vrhunska hrana za žabe koja tone od 3/32 inča, (Xenopus Express™, FL, SAD) ili ekvivalentna hrana.

Priprema drobljenih peleta za prelazak iz stadija ličinke u stadij mlade životinje

Peleti hrane za žabe koja tone nakratko se melju u mlincu za kavu, miješalici ili tarionikom i tučkom kako bi se smanjili za približno 1/3. Preduga obrada dovodi do nastanka praha i ne preporučuje se.

Protokol hranjenja

U **tablici 2.** nalazi se upućivanje na vrstu i količinu hrane koja se upotrebljava tijekom životnih stadija mladih i odraslih životinja. Životinje treba hraniti jednom dnevno. Treba napomenuti da, kako životinje prolaze kroz metamorfozu, nastavlja im se davati porcija račića Artemia dok više od 95 % životinja ne prođe kroz metamorfozu.

Životinje ne treba hraniti na dan završetka ispitivanja tako da hrana ne poremeti mjerenja mase.

Tablica 2.

Režim hranjenja mladih životinja *X. laevis* u protočnim uvjetima. Treba napomenuti da životinje koje ne prođu kroz metamorfozu, uključujući one čija je metamorfoza odgođena tretiranjem kemikalijom, ne mogu jesti pelete koji nisu razdrobljeni

Vrijeme (*) (Tjedni nakon srednjeg datuma metamorfoze)	Drobljeni peleti (mg po mladoj žabi)	Cijeli peleti (mg po mladoj žabi)
Po završetku metamorfoze životinja	25	0
Tjedni 0.–1.	25	28
Tjedni 2.–3.	0	110
Tjedni 4.–5.	0	165
Tjedni 6.–9.	0	220

(*) Prvi dan nultog tjedna srednji je datum metamorfoze kod kontrolnih životinja.

Dodatak 5.

ODREĐIVANJE GENETSKOG SPOLA

Metoda genetskog određivanja spola za vrstu *Xenopus laevis* temelji se na publikaciji Yoshimoto i dr., 2008. Podroban opis postupaka genotipizacije po potrebi se može pronaći u toj publikaciji. Mogu se upotrijebiti alternativne metode (npr. qPCR velike propusnosti) ako se to smatra primjerenim.

Početnice za vrstu *X. laevis*

Marker za DM-W

Uzvodna: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Nizvodna: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitivna kontrola

Uzvodna: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Nizvodna: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Pročišćavanje DNK-a

Treba pročititi DNK iz mišićnog tkiva ili tkiva kože upotrebom, na primjer, kompleta za krv i tkiva Qiagen DNeasy (kat. br. 69506) ili sličnog proizvoda u skladu s uputama za komplet. DNK se može eluirati iz kolona za pročišćavanje upotrebom manje količine pufera kako bi se dobili uzorci veće koncentracije ako se to smatra potrebnim za PCR. Napominje se da je DNK prilično stabilan pa treba paziti da se izbjegne unakrsna kontaminacija koja bi mogla dovesti do pogrešne karakterizacije mužjaka kao ženki ili obrnuto.

PCR

Uzorak protokola u kojem se upotrebljava JumpStartTMTaq proizvođača Sigma opisan je u **tablici 1.**

Tablica 1.

Uzorak protokola u kojem se upotrebljava JumpStartTMTaq proizvođača Sigma

Glavna mješavina	1x (μl)	[Konačno]
NFW (*)	11	–
10X pufer	2,0	–
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP-i (10 mM za svaki)	0,4	200 μM
Marker uzvodne početnice (8 μM)	0,8	0,3 μM
Marker nizvodne početnice (8 μM)	0,8	0,3 μM
Kontrola uzvodne početnice (8 μM)	0,8	0,3 μM
Kontrola nizvodne početnice (8 μM)	0,8	0,3 μM

Glavna mješavina	1x (μl)	[Konačno]
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 jedinica/μl
Kalup DNK-a	1,0	~ 200 pg/μl

(*) voda bez nukleaza

Napomena: kod pripreme glavnih mješavina treba pripremiti više nego što je potrebno kako bi se uzeo u obzir gubitak do kojeg može doći tijekom pipetiranja (na primjer: 25x treba upotrebljavati za samo 24 reakcije).

Reakcija:

Glavna mješavina	19,0 μl
Kalup	1,0 μl
Ukupno	20,0 μl

Profil uređaja za PCR:

Korak 1.	94 °C	1 min
Korak 2.	94 °C	30 s
Korak 3.	60 °C	30 s
Korak 4.	72 °C	1 min
Korak 5.	Idi na korak 2.	35 ciklusa
Korak 6.	72 °C	1 min
Korak 7.	4 °C	zadržati

Produkti PCR-a mogu se odmah razdvojiti u gelu ili pohraniti na temperaturi od 4 °C.

Elektroforeza u agaroznom gelu (3 %) (uzorak protokola)

50X TAE

Tris	24,2 g
Ledena octena kiselina	5,71 ml
Na ₂ (EDTA)·2H ₂ O	3,72 g

Dodati vodu do 100 ml

1X TAE

H ₂ O	392 ml
50X TAE	8 ml

Agaroz u omjeru 3: 1

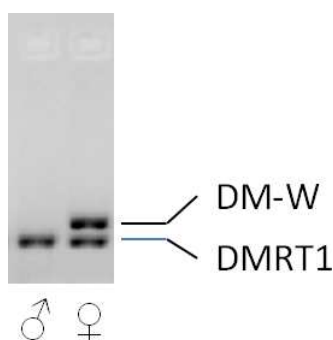
3 dijela agaroze NuSieve™ GTG™

1 dio agaroze niske elektroendoosmoze proizvođača Fisher (EEO)

Metoda

1. Pripremiti 3-postotni gel dodavanjem 1,2 g mješavine agaroze u 43 ml 1X TAE. Promiješati kako bi se odvojile velike grude.
2. Tretirati smjesu agaroze mikrovalovima dok se potpuno ne otopi (izbjegavati vrenje). Pustiti da se malo ohladi.
3. Dodati 1,0 µl etidijeva bromida (10 mg/ml). Promiješati tikvicu. Napominje se da je etidijev bromid mutagen pa bi, u mjeri u kojoj je to tehnički izvedivo, za ovaj korak trebalo upotrijebiti alternativne kemikalije kako bi se smanjili zdravstveni rizici za radnike ⁽¹⁾.
4. Uliti gel u kalup s češljem. Potpuno ohladiti.
5. Dodati gel u uređaj. Prekriti gel s 1X TAE.
6. Dodati 1 µl 6x boje za nanošenje u svakih 10 µl produkta PCR-a.
7. Pipetirati uzorke u jažice.
8. Razdvajati ~ 20 minuta na stalnih 160 volta.

Slika agaroznog gela koja prikazuje uzorke vrpce koji ukazuju na muške i ženske jedinke nalazi se na **slici 1**.



Slika 1. Slika agaroznog gela koja prikazuje uzorak vrpce koji ukazuje na mušku (♂) jedinku (jednostruka vrpca ~ 203 bp: DMRT1) i žensku (♀) jedinku (dvostruke vrpce pri ~ 259 bp: DM-W i 203 bp: DMRT1).

LITERATURA

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469.–2474.

⁽¹⁾ U skladu s člankom 4. stavkom 1. Direktive 2004/37/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o zaštiti radnika od rizika zbog izloženosti karcinogenim ili mutagenim tvarima na radu (šesta pojedinačna direktiva u smislu članka 16. stavka 1. Direktive Vijeća 89/391/EEZ) (SL L 158, 30.4.2004., str. 50.).

Dodatak 6.

MJERENJE VITELOGENINA

Vitelogenin (VTG) mjeri se upotrebom metode imunoenzimskog testa (ELISA) koji je izvorno razvijen za VTG debeloglave gavčice (Parks i dr., 1999.). Trenutačno ne postoje komercijalno dostupna protutijela za vrstu *X. laevis*. Međutim, s obzirom na veliku količinu informacija za taj protein i dostupnost isplativih komercijalnih usluga za proizvodnju protutijela, razumno je za očekivati da laboratoriji mogu jednostavno razviti test ELISA za to mjerenje (Olmstead i dr., 2009.). Olmstead i dr. (2009.) navode i opis testa izmijenjenog za VTG kod vrste *X. tropicalis*, kako je prikazano u nastavku. U metodi se upotrebljava protutijelo za VTG vrste *X. tropicalis*, ali poznato je da funkcionira i za VTG vrste *X. laevis*. Treba napomenuti da se mogu upotrebljavati i nekonkurentni testovi ELISA i da oni mogu imati niže granice otkrivanja od metode opisane u nastavku.

Materijali i reagensi

- Unaprijed adsorbirani serum 1. protutijela (Ab)
- Pomiješati jedan dio seruma 1. protutijela anti-*X. tropicalis* VTG s dva dijela kontrolne plazme mužjaka i ostaviti na sobnoj temperaturi na ~ 75 minuta, staviti na led 30 min, centrifugirati > 20K x G jedan sat na 4 °C, ukloniti supernatant, alikvotirati, pohraniti na – 20 °C.
- 2. protutijelo
- Kozji anti-zečji IgG-HRP konjugat (npr. Bio-Rad 172-1019)
- Standard VTG-a
- pročišćeni VTG vrste *X. laevis* od 3,3 mg/ml.
- TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidin) (npr. KPL 50-76-00 ili Sigma T0440)
- Obični kozji serum (NGS)(npr. Chemicon® S26 – 100 ml)
- EIA polistirenske mikrotitracijske ploče s 96 jažica (npr. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)
- Hibridizacijska peć temperature 37 °C (ili zračni inkubatori za brzo uravnoteživanje) za ploče, vodena kupelj za epruvete
- Ostala uobičajena laboratorijska oprema, kemikalije i zalihe

Recepti

Premazni pufer (50 mM karbonatni pufer, pH 9,6):

NaHCO ₃	1,26 g
Na ₂ CO ₃	0,68 g
voda	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfata, 1,5 M NaCl):

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,83 g
Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O	20,1 g
NaCl	71 g
voda	810 ml

Pufer za ispiranje (PBST):

10X PBS	100 ml
voda	900 ml

Prilagoditi pH-vrijednost na 7,3 s 1 M HCl, zatim dodati 0,5 ml kemikalije Tween-20

Testni pufer:

Obični kozji serum (NGS)	3,75 ml
Pufer za ispiranje	146,25 ml

Prikupljanje uzoraka

Krv se uzima s pomoću heparinizirane mikrohematokritske kapilarne cjevčice i stavlja na led. Nakon tri minute centrifugiranja cjevčica se ocjenjuje, otvara i plazma se stavlja u epruvete za mikrocentrifugu od 0,6 ml koje sadržavaju 0,13 jedinica liofiliziranog aprotinina (te se epruvete unaprijed pripremaju dodavanjem odgovarajuće količine aprotinina, zamrzavanjem i liofiliziranjem u vakuumskoj centrifugi na niskoj toplini dok se ne osuše). Plazma se sprema na temperaturi od – 80 °C dok se ne analizira.

Postupak za jednu ploču

Premazivanje ploče

Pomiješati 20 µl pročišćenog VTG-a s 22 ml karbonatnog pufera (konačna koncentracija od 3 µg/ml). Dodati 200 µl u svaku jažicu ploče s 96 jažica. Prekriti ploču ljepljivim filmom za zatvaranje i pustiti da se inkubira na 37 °C u trajanju od dva sata (ili 4 °C preko noći).

Blokiranje ploče

Otopina za blokiranje priprema se dodavanjem 2 ml običnog kozjeg seruma (NGS) u 38 ml pufera karbonata. Ukloniti otopinu premaza i osušiti protresanjem. Dodati 350 µl otopine za blokiranje u svaku jažicu. Prekriti ljepljivim filmom za zatvaranje i inkubirati na 37 °C u trajanju od dva sata (ili 4 °C preko noći).

Priprema standarda

Miješa se 5,8 µl pročišćenog standarda VTG-a s 1,5 ml testnog pufera u jednokratnoj epruveti od borosilikatnog stakla dimenzija 12 × 75 mm. Tako se dobiva 12 760 ng/ml. Zatim se provodi serijsko razrjeđivanje dodavanjem 750 µl prethodnog razrjeđenja u 750 µl testnog pufera kako bi se dobile konačne koncentracije od 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 i 50 ng/ml.

Priprema uzoraka

Početi s razrjeđivanjem plazme u testnom puferu u omjeru 1: 300 (npr. kombinirati 1 μ l plazme s 299 μ l testnog pufera) ili 1: 30. Ako se očekuje velika količina VTG-a mogu biti potrebna dodatna ili veća razrjeđenja. B/B₀ treba nastojati održati u rasponu standarda. Za uzorke bez znatnog VTG-a, npr. kontrolni mužjaci i ženke (svi su nezreli), upotrijebiti razrjeđivanje 1: 30. Slabije razrijeđeni uzorci mogu pokazati neželjene učinke matrice.

Osim toga, preporučuje se provođenje pozitivnog kontrolnog uzorka na svakoj ploči. On se uzima iz zalihe plazme koja sadržava visoke inducirane razine VTG-a. Zaliha se prvo razrjeđuje u NGS-u, dijeli u alikvote i pohranjuje na temperaturi od – 80 °C. Alikvot se odmrzava za svaku ploču, dodatno razrjeđuje u testnom puferu i obrađuje na sličan način kao i ispitni uzorak.

Inkubacija s 1. protutijelom

Prvo protutijelo priprema se izradom razrjeđenja unaprijed adsorbiranog seruma 1. protutijela u testnom puferu u omjeru 1: 2000 (npr. 8 μ l u 16 ml testnog pufera). Kombinirati 300 μ l otopine 1. protutijela i 300 μ l uzorka/standarda u staklenoj epruveti. Epruveta B₀ priprema se na sličan način s 300 μ l testnog pufera i 300 μ l protutijela. Isto tako, treba pripremiti epruvetu NSB upotrebom samo 600 μ l testnog pufera, tj. bez protutijela. Prekriti epruvete parafilmom i lagano protresti kako bi se promiješalo. Inkubirati jedan sat u vodenoj kupelji na temperaturi od 37 °C.

Ispiranje ploče

Isprati ploču neposredno prije dovršetka inkubacije 1. protutijela. To se obavlja izlivanjem sadržaja i tapšanjem upijajućim papirom dok se ne osuši. Zatim napuniti jažice s 350 μ l otopine za ispiranje, proliti i osušiti tapšanjem. Za to je korisna višekanalna repetitivna pipeta ili ispirać ploča. Korak ispiranja ponavlja se još dva puta tako da se ukupno ispiru tri puta.

Punjenje ploče

Nakon što se ploča ispere ukloniti epruvete iz vodene kupke i lagano promiješati. Dodati 200 μ l iz svake epruvete uzorka, standarda, B₀ i NSB-a u dvije jažice ploče. Prekriti ploču ljepljivim filmom za zatvaranje i pustiti da se inkubira jedan sat na 37 °C.

Inkubacija s 2. protutijelom

Na kraju inkubacije iz prethodnog koraka ploču opet treba isprati tri puta, kako je prethodno opisano. Razrijeđeno 2. protutijelo priprema se miješanjem 2,5 μ l 2. protutijela s 50 ml testnog pufera. Dodati 200 μ l razrijeđenog 2. protutijela u svaku jažicu, zatvoriti kako je prethodno opisano i inkubirati jedan sat na 37 °C.

Dodavanje supstrata

Nakon dovršetka inkubacije s 2. protutijelom isprati ploču tri puta kako je prethodno opisano. Zatim u svaku jažicu dodati 100 μ l supstrata TMB. Pustiti da se reakcija odvija deset minuta, po mogućnosti ne na jarkoj svjetlosti. Zaustaviti reakciju dodavanjem 100 μ l fosforne kiseline od 1 M. Time će se boja promijeniti iz plave u intenzivnu žutu. Izmjeriti apsorbanciju pri 450 nm upotrebom čitača ploča.

Izračun vrijednosti B/Bo

Oduzeti vrijednost NSB od svih mjerenja. B/B₀ za svaki uzorak i standard računa se tako da se vrijednost apsorbancije (B) podijeli prosječnom apsorbancijom uzorka B₀.

Dobivanje standardne krivulje i utvrđivanje nepoznatih količina

Izraditi standardnu krivulju s pomoću nekog računalnog softvera za izradu grafova (npr. SlidewriteTM ili Sigma Plot[®]) kojim će se ekstrapolirati količina iz vrijednosti B/B₀ uzorka na temelju vrijednosti B/B₀ standarda. Količina se obično grafički prikazuje na logaritamskoj skali i krivulja ima sigmoidni oblik. Međutim, može se činiti linearnom ako se upotrebljava uzak raspon standarda. Ispraviti količine uzorka za faktor razrjeđivanja i navesti u obliku miligrama VTG-a po mililitru plazme.

Utvrđivanje najnižih granica detekcije (MDL, engl. minimum detection limits)

Često neće biti jasno, osobito kod normalnih mužjaka, kako izvijestiti o rezultatima iz niskih vrijednosti. U tim slučajevima treba upotrijebiti granicu pouzdanosti od 95 % kako bi se utvrdilo treba li vrijednost prikazati kao nulu ili neki drugi broj. Ako je rezultat uzorka unutar intervala pouzdanosti nultog standarda (B_0), rezultat treba prikazati kao nulu. Najniža razina detekcije bit će najniži standard koji je dosljedno različit od nultog standarda; drugim riječima, ta dva intervala pouzdanosti ne preklapaju se. Za bilo koji rezultat uzorka koji je unutar granice pouzdanosti najmanje razine detekcije ili veći, izvijestit će se o izračunanoj vrijednosti. Ako se uzorak nalazi između nultog standarda i intervala pouzdanosti najmanje granice detekcije, kao vrijednost tog uzorka treba navesti polovinu najmanje razine detekcije.

LITERATURA

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117.-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 123: 113.-125.

Dodatak 7.

STATISTIČKA ANALIZA

U testu LAGDA nastaju tri oblika podataka koji se statistički analiziraju: 1. kvantitativni kontinuirani podaci; 2. podaci o vremenu do određenog događaja za stope razvoja (vrijeme do 62. stadija NF-a) i 3. ordinalni podaci u obliku ocjena ozbiljnosti ili razvojnih stadija iz histopatoloških ocjena. Shema odlučivanja preporučene statističke analize za test LAGDA prikazana je na slici 1. Isto tako, u nastavku su navedene i određene bilješke koje će možda biti potrebne za provedbu statističke analize za mjerenja iz testa LAGDA. Za shemu odlučivanja analize, rezultate mjerenja za smrtnost, rast (masa i duljina) te somatski indeks jetre (LSI) treba analizirati u skladu s granom „Ostale krajnje točke”.

Kontinuirani podaci

Podatke za kontinuirane krajnje točke prvo treba provjeriti u pogledu monotoničnosti tako da se podaci transformiraju rangiranjem, prilagode modelu ANOVA i da se usporede linearni i kvadratni kontrasti. Ako su podaci monotonični, treba provesti postupni Jonckheere-Terpstraov test trenda na medijanima ponavljanja i ne treba primijeniti nikakvu naknadnu analizu. Alternativa za podatke koji su normalno distribuirani s homogenim varijancama jest Williamsov test postupnog snižavanja. Ako podaci nisu monotonični (kvadratni je kontrast znatan, a linearni nije), treba ih analizirati upotrebom modela ANOVA s miješanim učincima. Podatke zatim treba procijeniti u pogledu normalnosti (po mogućnosti upotrebom Shapiro-Wilksova ili Anderson-Darlingova testa) i homogenosti varijanci (po mogućnosti upotrebom Leveneova testa). Oba se testa provode na rezidualima iz modela ANOVA s miješanim učincima. Umjesto tih formalnih ispitivanja normalnosti i homogenosti varijanci, može se upotrebljavati stručna procjena iako su formalni testovi poželjni. Ako su podaci normalno distribuirani s homogenim varijancama, pretpostavke ANOVA-e s miješanim učincima ispunjene su i značajan učinak tretiranja utvrđuje se Dunnettovim testom. Ako se utvrdi nenormalnost ili heterogenost varijanci, prekršene su pretpostavke Dunnettova testa i traži se normalizirajuća pretvorba za stabiliziranje varijanci. Ako se ne pronađe takva pretvorba, značajan učinak tretiranja utvrđuje se Dunnovim testom. Kad god je to moguće treba provesti jednosmjerno testiranje za razliku od dvosmjernog testiranja, ali potrebna je stručna prosudba kako bi se utvrdilo koji je test primjeren za određenu krajnju točku.

Smrtnost

Podatke o smrtnosti treba analizirati za razdoblje koje obuhvaća cijeli test i treba ih izraziti kao udio životinja koje su uginule u svim pojedinačnim spremnicima. Punoglavce koji ne dovrše metamorfozu u utvrđenom roku, punoglavce iz poduzorka ličinki, mlade žabe koje se izdvajaju i sve životinje koje uginu zbog pogreške osobe koja provodi pokus treba tretirati kao cenzurirane podatke i ne treba ih uključiti u nazivnik izračuna postotka. Prije bilo kakve statističke analize udjele smrtnosti treba provesti transformacijom arkus sinusa drugog korijena. Kao druga mogućnost može se upotrijebiti Cochran-Armitageov test postupnog snižavanja, možda s Rao-Scottovom prilagodbom ako je prisutna pretjerana disperzija.

Masa i duljina (podaci o rastu)

Mužjaci i ženke nisu spolno dimorfni tijekom metamorfoze pa podatke o rastu iz poduzorka ličinki treba analizirati neovisno o spolu. Međutim, podatke o rastu mladih životinja treba analizirati zasebno na temelju genetskog spola. Za te će krajnje točke možda biti potrebne logaritamske pretvorbe jer nije neuobičajena logaritamska normalnost podataka o veličini.

Somatski indeks jetre (LSI)

Mase jetre treba normalizirati kao udjele masa cijelog tijela (tj. LSI) i analizirati zasebno na temelju genetskog spola.

Vrijeme do 62. stadija NF-a

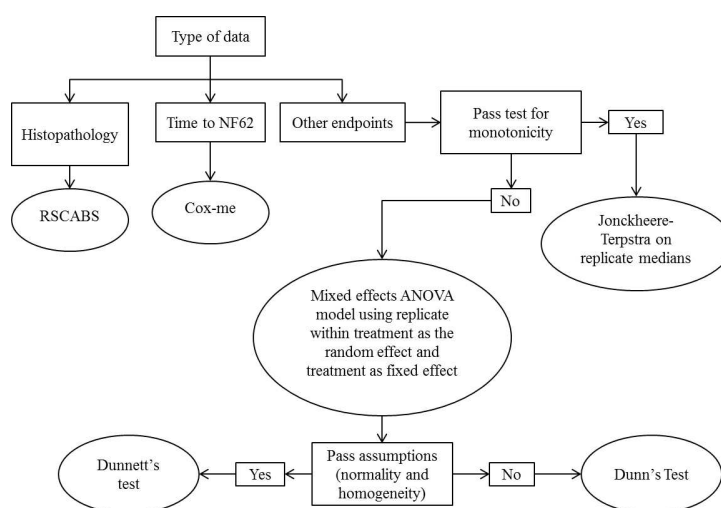
Podatke o vremenu do metamorfoze treba tretirati kao podatke o vremenu do određenog događaja, a smrtne slučajeve ili jedinke koje ne dosegnu 62. stadij NF-a za 70 dana treba tretirati kao podatke koji se cenzuriraju desno (tj. prava vrijednost veća je od 70 dana, ali studija završava prije nego što životinje dosegnu 62. stadij NF-a u 70 dana). Za utvrđivanje datuma kraja ispitivanja treba upotrijebiti srednje vrijeme do dovršetka metamorfoze u 62. stadiju NF-a u kontrolama s vodom za razrjeđivanje. Srednje vrijeme do dovršetka metamorfoze moglo bi se utvrditi Kaplan-Meierovim procjeniteljima ograničenja produkta. Tu krajnju točku treba analizirati upotrebom Coxova modela proporcionalne opasnosti s miješanim učincima kojim se uzima u obzir struktura ponavljanja studije.

Histopatološki podaci (ocjene ozbiljnosti i razvojni stadiji)

Histopatološki podaci u obliku su ocjena ozbiljnosti ili razvojnih stadija. U testu nazvanom RSCABS (engl. *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices*) upotrebljava se Cochran-Armitageov test trenda postupnog snižavanja s Rao-Scottovom prilagodbom na svakoj razini ozbiljnosti u histopatološkom odgovoru (Green i dr., 2014.). Rao-Scottovom prilagodbom u test se uključuje plan izvođenja pokusa u posudama s ponavljanjima. Postupak u dijelovima (engl. *by Slices*) uključuje biološko očekivanje da se ozbiljnost učinka obično povećava s povećanjem doza ili koncentracija, uz zadržavanje ocjena za pojedinačne ispitne životinje i otkrivanje ozbiljnosti bilo kakvog utvrđenog učinka. Postupkom RSCABS ne utvrđuje se samo koja su tretiranja statistički različita od kontrola (tj. imaju ozbiljniju patologiju od kontrola), već se utvrđuje i pri kojoj ocjeni ozbiljnosti dolazi do razlike, čime se osigurava i neophodan kontekst za analizu. U slučaju određivanja stadija razvoja gonada i reproduktivnih kanala, na podatke treba primijeniti dodatnu manipulaciju jer se u RSCABS-u pretpostavlja da se ozbiljnost učinka povećava s povećanjem doze. Uočeni učinak mogla bi biti odgoda ili ubrzanje razvoja. Stoga podatke o određivanju stadija razvoja treba analizirati kako je navedeno da bi se otkrio ubrzani razvoj i zatim ručno obrnuti prije druge analize za otkrivanje kašnjenja u razvoju.

Slika 1.

Shema odlučivanja statističke analize za test LAGDA



LITERATURA

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1108.–1116.

Dodatak 8.

RAZMATRANJA ZA PRAĆENJE I SMANJENJE UČESTALOSTI POJAVE SKOLIOZE

Idiopatska skolioza, koja se kod punoglavaca *Xenopus laevis* obično očituje kao savijeni rep, može otežati morfološka opažanja i opažanja ponašanja kod ispitnih populacija. Treba nastojati smanjiti ili ukloniti pojavu skolioze, i u matičnoj kulturi i u ispitnim uvjetima. Preporučuje se da u konačnom ispitivanju učestalost pojave umjerene i teške skolioze bude manja od 10 % kako bi se poboljšala pouzdanost da se ispitivanjem mogu otkriti razvojni učinci povezani s tretiranjem kod ličinki vodozemaca koje su inače zdrave.

U svakodnevnim opažanjima tijekom konačnog ispitivanja treba evidentirati učestalost (pojedinačni broj) i ozbiljnost skolioze, ako je prisutna. Prirodu abnormalnosti treba opisati s obzirom na lokaciju (npr. ispred ili iza kloake) i smjer zakrivljenosti (npr. bočno ili od leđne do trbušne strane). Ozbiljnost se može ocijeniti na sljedeći način:

(NR) Nije značajna: nema zakrivljenosti

(1) Minimalna: lagana bočna zakrivljenost iza kloake; vidljiva samo pri mirovanju

(2) Umjerena: bočna zakrivljenost iza kloake; vidljiva stalno, ali ne sprječava kretanje

(3) Teška: bočna zakrivljenost ispred kloake ILI bilo kakva zakrivljenost koja sprječava kretanje ILI zakrivljenost od leđne do trbušne strane

Znanstvena savjetodavna komisija američke agencije EPA FIFRA (FIFRA SAP 2013.) pregledala je sažete podatke za skoliozu u 15 analiza metamorfoze vodozemaca s vrstom *X. laevis* (od 51. do 60. i kasnijih stadija NF-a) i dala je opće preporuke za smanjenje učestalosti pojave te abnormalnosti u ispitnim populacijama. Preporuke su relevantne za test LAGDA iako ovo ispitivanje ne uključuje dulji vremenski okvir razvoja.

Uspješnost mriješćenja u prijašnjim ispitivanjima

Obično bi se kao uzgojni parovi trebale upotrebljavati visokokvalitetne, zdrave, odrasle životinje; uklanjanjem uzgojnih parova koji daju potomke sa skoliozom može se s vremenom smanjiti učestalost njezine pojave. Točnije, može biti korisno smanjiti upotrebu divlje ulovljenih životinja za rasplod. Razdoblje izlaganja u testu LAGDA započinje s embrijima od 8. do 10. stadija NF-a i na početku ispitivanja nije moguće utvrditi hoće li se kod određenih jedinki javiti skolioza. Stoga uz praćenje učestalosti pojave skolioze kod životinja koje se ispituju treba evidentirati i prijašnju uspješnost legla (uključujući učestalost pojave skolioze kod svih ličinki kojima je omogućen razvoj). Može biti korisno nastaviti pratiti dio svakog legla koji se ne upotrebljava u određenoj studiji i izvijestiti o tim opažanjima (FIFRA SAP 2013.).

Kakvoća vode

Važno je osigurati primjerenu kakvoću vode, i u laboratorijskoj zalihi i tijekom ispitivanja. Uz kriterije kakvoće vode koji se rutinski ocjenjuju za ispitivanja toksičnosti u vodi, može biti korisno pratiti i ispraviti bilo kakve nedostatke hranjivih tvari (npr. nedostatak vitamina C, kalcija, fosfora) ili previsoke razine selena i bakra, za koje je navedeno da u različitim stupnjevima uzrokuju skoliozu kod vrsta *Rana* sp. i *Xenopus* sp. uzgojenih u laboratoriju (Marshall i dr., 1980.; Leibovitz i dr., 1992.; Martinez i dr., 1992; kako je navedeno u FIFRA SAP 2013.). Upotrebom primjerenog režima prehrane (vidjeti Dodatak 4.) i redovitim čišćenjem spremnika općenito će se poboljšati kakvoća vode i zdravlje ispitnih uzoraka.

Prehrana

Posebne preporuke za režim prehrane, za koji se pokazalo da je uspješan u testu LAGDA, podrobno su opisane u Dodatku 4. Preporučuje se da se izvori hrane pregledaju u pogledu bioloških toksina, herbicida i ostalih vrsta pesticida za koje je poznato da uzrokuju skoliozu kod vrste *X. laevis* ili drugih vodenih životinja (Schlenk i Jenkins 2013.). Na primjer, izlaganje određenim inhibitorima kolinesteraze povezano je sa skoliozom u riba (Schultz i dr., 1985.) i žaba (Bacchetta i dr., 2008.).

LITERATURA

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment*, 392.: 110.–118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185.-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 13: 322.-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 11: 445.-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraiez, and P. Herraiez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. *Anatomical Records* 233(2): 314.-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. 21. – 23. svibnja 2013. Washington, DC.”
