

## II

(Nem jogalkotási aktusok)

## RENDELETEK

## A BIZOTTSÁG 640/2012/EU RENDELETE

(2012. július 6.)

**a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról szóló 440/2008/EK bizottsági rendeletnek a műszaki fejlődéshez való hozzáigazítása céljából történő módosításáról**

(EGT-vonatkozású szöveg)

AZ EURÓPAI BIZOTTSÁG,

tekintettel az Európai Unió működéséről szóló szerződésre,

tekintettel a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyagügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/EGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről szóló, 2006. december 18-i 1907/2006/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletre <sup>(1)</sup> és különösen annak 13. cikke (3) bekezdésére,

mivel:

- (1) A 440/2008/EK bizottsági rendelet <sup>(2)</sup> tartalmazza az 1907/2006/EK rendelet céljából alkalmazandó anyagok fizikai-kémiai tulajdonságainak, toxicitásának és ökotoxicitásának meghatározására szolgáló vizsgálati módszereket.
- (2) A kísérleti célokra felhasznált állatok számának csökkentése érdekében szükséges a 440/2008/EK rendeletet a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló, 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU európai parlamenti és tanácsi irányelvvel <sup>(3)</sup>, valamint a kísérleti és egyéb

tudományos célokra felhasznált állatok védelmére vonatkozó tagállami törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló, 1986. november 24-i 86/609/EGK tanácsi irányelvvel <sup>(4)</sup> összhangban aktualizálni, hogy a rendeletbe bekerüljenek az OECD által a közelmúltban elfogadott, kiemelt, új és aktualizált vizsgálati módszerek. E rendelet tervezetéről egyeztetés történt az érdekeltekkel.

- (3) A 440/2008/EK rendeletet ezért ennek megfelelően módosítani kell.
- (4) Az ebben a rendeletben előírt intézkedések összhangban vannak az 1907/2006/EK rendelet 133. cikkével létrehozott bizottság véleményével,

ELFOGADTA EZT A RENDELETET:

1. cikk

A 440/2008/EK rendelet melléklete az e rendelet mellékletében foglaltak szerint módosul.

2. cikk

Ez a rendelet az *Európai Unió Hivatalos Lapjában* történő kihirdetését követő harmadik napon lép hatályba.

<sup>(1)</sup> HL L 396., 2006.12.30., 1. o.

<sup>(2)</sup> HL L 142., 2008.5.31., 1. o.

<sup>(3)</sup> HL L 276., 2010.10.20., 33. o.

<sup>(4)</sup> HL L 358., 1986.12.18., 1. o.

Ez a rendelet teljes egészében kötelező és közvetlenül alkalmazandó valamennyi tagállamban.

Kelt Brüsszelben, 2012. július 6-án.

*a Bizottság részéről*  
*az elnök*  
José MANUEL BARROSO

---

## MELLÉKLET

A 440/2008/EK rendelet melléklete a következőképpen módosul:

1. A B.42. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

**„B.42. BŐRSZENIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER**

## BEVEZETÉS

1. Az OECD vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozó iránymutatásait és az ezeken alapuló uniós vizsgálati módszereket időnként felülvizsgálják a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és állatjóléti megfontolások fényében. A bőrszenibilizáció egereken történő meghatározására irányuló eredeti vizsgálati módszert, a lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer (LLNA; az OECD 429. vizsgálati iránymutatása; e melléklet B.42. fejezete) már korábban elfogadásra került (1). Az LLNA hitelesítésére vonatkozó információk és az ezzel kapcsolatos munka áttekintése a (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11) hivatkozásban található. Az aktualizált LLNA a tapasztalatok és tudományos adatok értékelésén alapul (12). Ez a második olyan vizsgálati módszer, amely a vegyi anyagok (anyagok és keverékek) bőrszenibilizációt okozó hatásának állatokon történő vizsgálatára szolgál. A másik vizsgálati módszer (vagyis az OECD 406. vizsgálati iránymutatása; e melléklet B.6. fejezete) tengerimalacon végzett vizsgálatokat alkalmaz, nevezetesen a tengerimalac-maximizációs módszert és a Bühler-vizsgálatot (13). Az állatjólét szempontjából az LLNA előnyösebb a B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában szereplő módszereknél (13). Ez az aktualizált LLNA vizsgálati módszer több olyan teljesítményszabványt (1. függelék) foglal magában, amelyek alkalmazhatók az LLNA-hoz funkcionálisan és módszertanilag hasonló új és/vagy módosított vizsgálati módszerek hitelesítési státusának az OECD 34. iránymutatásában foglalt elvekkel összhangban történő értékeléséhez (14).
2. Az LLNA a bőrszenibilizáció indukciós fázisát vizsgálja, és a dózis-válasz vizsgálatához alkalmazható kvantitatív adatokat szolgáltat. Megjegyzendő, hogy azok az enyhén/közepesen szenibilizáló anyagok, amelyeket a tengerimalac-vizsgálati módszerekhez pozitív kontrollanyagként ajánlanak (vagyis B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (13), az LLNA-nál is alkalmazhatók (6) (8) (15). E vizsgálati módszer esetében lehetőségként ismertetésre kerül a csökkentett LLNA (rLLNA) módszer is, amelyet akár 40 %-kal kevesebb állattal is el lehet végezni (16) (17) (18). Az rLLNA olyan esetekben alkalmazható, amikor a szabályozási előírásoknak megfelelően igazolni kell a feltételezett negatív bőrszenibilizáló hatást, azzal a feltétellel, hogy a vizsgálati módszer e leírásában foglaltaknak megfelelően az LLNA protokolljában szereplő összes egyéb előírást betartják. A negatív eredmény feltételezésének a 4. bekezdésben leírtak szerint az összes rendelkezésre álló adaton kell alapulnia. Az rLLNA módszer alkalmazása előtt egyértelműen meg kell indokolni a módszert alkalmazását, és ismertetni kell az alkalmazását alátámasztó tudományos magyarázatot. Amennyiben az rLLNA a várakozásokkal ellentétben pozitív vagy kétes eredményt ad, az eredmény értelmezéséhez és tisztázásához további vizsgálatokra lehet szükség. Az rLLNA nem használható bőrszenibilizáló vizsgált anyagok veszélyességének meghatározását célzó vizsgálatokhoz abban az esetben, ha dózis-válasz információra van szükség, mint például az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendelet és az ENSZ vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere szerinti alkategóriákba sorolás esetében.

## FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

3. Az alkalmazott fogalmak meghatározása a 2. függelékben található.

## KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. Az LLNA alternatív módszert jelent a lehetséges bőrszenibilizáló vegyi anyagok meghatározására. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy minden esetben az LLNA-t kell alkalmazni a tengerimalac-vizsgálat (lásd B.6. fejezet, az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (14) helyett, inkább azt, hogy ez a vizsgálati módszer ugyanolyan hasznos, és olyan alternatív módszerként alkalmazható, amely esetében a pozitív és negatív eredmények általában már nem igényelnek további megerősítést. A vizsgálat elvégzése előtt a vizsgáló laboratóriumnak a vizsgált anyagról rendelkezésre álló összes adatot figyelembe kell vennie. Ezen információk közé tartozik a vizsgált anyag azonosítása, kémiai szerkezete, fizikai-kémiai tulajdonságai, valamint a vizsgált anyaggal korábban végzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei és a szerkezeti rokon vegyi anyagok toxikológiai adatai is. Mindezen információk figyelembevételével dönthető el, hogy a LLNA alkalmazható-e az adott anyag esetében (tekintve, hogy bizonyos vegyi anyag-típusoknál inkompatibilitás áll fenn az LLNA-val (lásd az (5) bekezdést), és milyen dózist célszerű választani a vizsgálatokhoz).
5. Az LLNA *in vivo* módszer, következésképpen nem küszöbölhető ki vele az állatok felhasználása az allergiás kontakt szenibilizáló hatás vizsgálata során. Ugyanakkor csökkenteni lehet vele az e célra felhasznált állatok számát. Az LLNA emellett az állatok kontakt szenibilizációs vizsgálatok során történő felhasználásának módját tekintve jelentősen kíméletesebb (kevesebb fájdalommal és szenvedéssel jár). Az LLNA azon immunológiai történések figyelmes vizsgálatán alapul, amelyeket a vegyi anyagok a szenibilizáció indukciós fázisában stimulálnak. A tengerimalac-vizsgálatról (B.6.; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (13) eltérően az LLNA-hoz nincs szükség indukált bőr-hiperszenzitivitási reakciók előidézésére. A tengerimalac-maximizációs vizsgálat ellentétben nincs szükség adjuváns alkalmazására sem (13). Az LLNA alkalmazásával tehát csökkenthető az állatokra érő fájdalom és szenvedés mértéke. Az LLNA-nak a B.6. pont és az OECD 406. vizsgálati iránymutatása szerinti vizsgálatokkal szembeni előnyei ellenére el kell ismerni, hogy a módszernek vannak olyan korlátai (pl. az LLNA hamis negatív

eredményei egyes fémek, vagy hamis pozitív eredményei bizonyos bőrirritáló anyagok, [például bizonyos felületaktív szerek] esetében (19) (20), illetve a vizsgált anyag oldhatósága), amelyek szükségessé teszik a B.6. pont és az OECD 406. vizsgálati iránymutatása szerinti vizsgálatok alkalmazását (21). Továbbá az olyan kémiai osztályok vagy funkcionális csoportot tartalmazó anyagok, amelyek lehetséges zavaró tényezőként szerepelnek (21) szükségessé tehetik a tengerimalac-vizsgálatok (vagyis a B.6. pont; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) használatát (13). Emellett a hitelesítési adatbázis hiányosságai miatt, amely elsősorban peszticid készítmények adataiból áll, az LLNA a tengerimalac-vizsgálatnál nagyobb valószínűséggel ad pozitív eredményt az ilyen típusú vizsgált anyagok esetében (22). A készítmények vizsgálatakor azonban, az LLNA megfelelő működésének bizonyításához meg lehet fontolni az ismert eredménnyel rendelkező, hasonló anyagok referenciaanyagként történő bevonását is (lásd 16. bekezdés). E meghatározott hiányosságokon kívül, az LLNA bármilyen anyag vizsgálatára megfelelő, kivéve, ha ezek az anyagok olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek befolyásolják az LLNA pontosságát.

#### A VIZSGÁLAT ELVE

6. Az LLNA módszer háttérben az az alapelv áll, hogy a szenzibilizáló anyagok elsődleges limfocitaprolierációt indukálnak a vizsgált anyag alkalmazási területének nyirokvezetéséről gondoskodó nyirokcsomókban. Ez a proliferáció arányos az alkalmazott allergén dóziséval és erősségével, valamint egyszerű módszert biztosít a szenzibilizáció kvantitatív méréséhez. A proliferációt úgy mérik, hogy a vizsgálati csoportokban mért átlagos proliferációt összehasonlítják a vivőanyaggal kezelt csoportban mért proliferációval. Meghatározzák az egyes kezelt csoportokban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokban mért átlagos proliferáció arányát, amelyet stimulációs indexnek (SI) neveznek, és amelynek legalább  $\geq 3$ -nak kell lennie ahhoz, hogy indokolt legyen a vizsgált anyag potenciális bőrszenzibilizáló anyagként történő besorolása. Az itt ismertetett eljárások *in vivo* radioaktív anyaggal történő jelölésen alapulnak, amellyel mérhető az elvezető aurikuláris nyirokcsomókban lévő proliferáló sejtek számának növekedése. A proliferációs sejtek számának vizsgálatára azonban más végpontok is alkalmazhatók, feltéve, hogy a PS követelmények maradéktalanul teljesülnek (1. függelék).

#### A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

##### Az állatfaj kiválasztása

7. Ehhez a vizsgálathoz az egér a választandó faj. A CBA/Ca vagy CBA/J törzsbe tartozó, fiatal felnőtt nullipara és nem vemhes nőstény egereket kell használni. A vizsgálat elején az állatok korának 8–12 hétnak kell lennie, az állatok testtömege között az eltérésnek minimálisnak kell lennie, és a testtömeg nem haladhatja meg az átlagos testtömeg 20 %-át. Ha elegendő adat áll rendelkezésre arra nézve, hogy az LLNA módszerrel kapott válaszreakcióban nincsenek jelentős törzs- és/vagy ivarspecifikus különbségek, akkor más törzsek, illetve hím állatok is alkalmazhatók.

##### Az állatok tartásának és etetésének körülményei

8. Az egereket csoportosan kell tartani (23), kivéve, ha az egyedenkénti tartásra megfelelő tudományos indok merül fel. A kísérleti állatok tartásául szolgáló helyiség hőmérsékletének  $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ -nak kell lennie. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem haladhatja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos, 12 órás sötét periódusok váltakozásával. Az etetéshez a szokásos laboratóriumi takarmány alkalmazható korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

##### Az állatok előkészítése

9. Az állatokat véletlenszerűen választják ki, majd egyedi azonosítóval látják el (viszont az állat fülén semmiféle azonosító nem alkalmazható), és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben tartják őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez. A kezelés megkezdése előtt minden állatot megvizsgálunk, hogy meggyőződjenek arról, nincs rajtuk látható bőrsérülés.

##### A dózisok előkészítése

10. A szilárd halmazállapotú vegyi anyagokat az egér fülén történő alkalmazás előtt oldószerben/vivőanyagban kell feloldani vagy szuszpendálni, és szükség esetén hígítani kell. A folyadék halmazállapotú vegyi anyagokat hígítatlanul vagy az adagolás előtt hígított formában lehet alkalmazni. A nem oldható vegyi anyagokat, például az orvosi eszközökben általánosan előforduló anyagokat megfelelő oldószerben történő agresszív extrakciónak kell kitenni, hogy a vizsgálat során az egér fülén való alkalmazás előtt az összes kivonható összetevőt feltárjuk. A vizsgált anyagokat naponta kell elkészíteni, kivéve, ha stabilitási adatok igazolják, hogy a tárolás elfogadható.

##### A megbízhatóság ellenőrzése

11. A vizsgálat megfelelő teljesítményének megfelelő és reprodukálható szenzitivitással adott válaszreakciókkal történő igazolására pozitív kontrollanyagokat (PK) alkalmaznak; ezek olyan szenzibilizáló tesztanyagok, amelyek esetében a válaszreakció mértéke pontosan meghatározott. Pozitív kontroll párhuzamos vizsgálata ajánlott, mivel ez igazolja, hogy a laboratórium megfelelő szakértelemmel végzi az egyes vizsgálatokat, és lehetővé teszi a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság és összehasonlíthatóság értékelését. Néhány szabályozó hatóság szintén előírja a pozitív kontroll minden vizsgálat során történő alkalmazását, ezért az LLNA módszer elvégzése előtt ajánlott egyeztetni az illetékes hatóságokkal. Ennek megfelelően javasolt a pozitív kontroll rutinszerű párhuzamos vizsgálata, hogy elkerülhetőek legyenek az olyan további állatkísérletek, amelyeket a pozitív kontrollt csak időszakosan alkalmazó laboratórium az előírásoknak való megfelelés érdekében végezne

- (lásd a 12. bekezdést). A pozitív kontrollnak az LLNA módszerrel olyan expozíciós szint mellett kell pozitív válaszreakciót adnia, amely a negatív kontrollcsoporthoz (NK) képest várhatóan legalább 3-mal növeli a stimulációs indexet (SI). A pozitív kontroll dózisát úgy kell megválasztani, hogy ne okozzon túlzott bőrirritációt vagy szisztémás toxicitást, és az indukció reprodukálható, de ne túl nagymértékű legyen (tehát  $SI > 20$  már túlzottnak tekinthető). Az előnyben részesítendő pozitív kontrollanyagok a 25 %-os hexil-cinnemaldehid (Chemical Abstracts Service [CAS] szám: 101-86-0) aceton: olívaolaj (4:1, v/v) keverékében és 5 %-os merkaptobenzotiazol (CAS-szám: 149-30-4) N,N-dimetilformamidban (lásd 1. függelék, 1. táblázat). Adódhatnak olyan körülmények, amelyek fennállásakor, megfelelő indoklás esetén a fenti kritériumoknak megfelelő más pozitív kontrollanyagok is alkalmazhatók.
12. Bár ajánlott a pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata, lehetnek azonban olyan helyzetek, amikor a pozitív kontroll időszakos (például legalább 6 havonta végzett) vizsgálata elfogadható lehet az olyan, az LLNA vizsgálatot rendszeresen (vagyis legalább havonta egyszeri gyakorisággal) végző laboratóriumok esetében, amelyek rendelkeznek a pozitív kontrollok igazolt, historikus adatbázisával, és ezzel bizonyítható, hogy a laboratórium a pozitív kontrollokkal képes reprodukálható és pontos eredményeket előállítani. Az LLNA módszerben való jártasság alátámasztható a pozitív kontrollal megfelelő időszakon belül (kevesebb mint egy éve) végzett legalább 10 független vizsgálat során kapott következetesen pozitív eredményekkel.
  13. Pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata minden alkalommal szükséges, valahányszor az LLNA vizsgálat módszerében változtatást hajtanak végre (például a képzett személyzet, a vizsgálati eljárás során használt anyagok és/vagy reagensek, a vizsgálati eszközök, vagy a kísérleti állatok beszerzési forrásának megváltoztatása), és ezeket a változásokat dokumentálni kell a laboratóriumi jelentésekben. Figyelembe kell venni, hogy ezek a változtatások mennyiben befolyásolják a korábban létrehozott historikus adatbázis megfelelőségét, és el kell dönteni, hogy szükséges-e új historikus adatbázis felállítása a pozitív kontroll eredményei következetességének dokumentálása érdekében.
  14. A vizsgálatot végző személyeknek tisztában kell lenniük azzal, hogy amennyiben a párhuzamos vizsgálat helyett a pozitív kontrollok időszakos vizsgálata mellett döntenek, ez hatással lehet a pozitív kontrollok időszakos vizsgálata közötti időszakokban, párhuzamos pozitív kontroll vizsgálata nélkül előállított negatív vizsgálati eredmények megfelelőségére és elfogadhatóságára. Ha például a pozitív kontrollal végzett időszakos vizsgálat álnegatív eredményt adott, akkor megkérdőjelezhetők azok a negatív eredmények, amelyek az utolsó elfogadható eredményű és az elfogadhatatlan eredményű időszakos pozitív kontroll vizsgálat között eltelt időszakban keletkeztek. Az ilyen következmények jelentőségét körültekintően mérlegelni kell annak eldöntésekor, hogy pozitív kontrollokat párhuzamosan vagy csak időszakosan vizsgáljanak-e. Szintén megfontolandó a kevesebb állat használata a párhuzamos pozitív kontrollcsoportban, amennyiben ez tudományosan indokolt, és a laboratóriumra specifikus historikus adatok alapján a laboratórium igazolja, hogy megfelelő a kevesebb egér használata (12).
  15. Bár a pozitív kontrollt olyan vivőanyagban kell vizsgálni, amelyről ismert, hogy következetes válaszreakciót vált ki (például aceton:olívaolaj; 4:1, v/v arányú keveréke), lehetnek olyan szabályozási helyzetek, amikor nem szokványos vivőanyagokban (klinikailag/kémiaiilag releváns készítmény) történő vizsgálat elvégzésére is szükség van (24). Amennyiben a párhuzamos pozitív kontrollt a vizsgált anyagétól eltérő vivőanyagban vizsgálják, akkor a párhuzamos pozitív kontrollal együtt egy külön vivőanyagot is vizsgálni kell.
  16. Azokban az esetekben, amikor egy bizonyos vegyi csoportba tartozó vizsgált anyagokat vagy a válaszreakciók tartományát értékelik, szintén hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása annak igazolására, hogy a vizsgálati módszer megfelelően működik az ilyen típusú vizsgált anyagok bőrszenzibilizáló hatásának kimutatására. A megfelelő referenciaanyagoknak a következő tulajdonságokkal kell rendelkezniük:
    - szerkezeti és funkcionális hasonlóság a vizsgált anyag csoportjával,
    - ismert fizikai/kémiai tulajdonságok,
    - az LLNA módszerrel kapott alátámasztó adatok,
    - egyéb állatmodellekből és/vagy emberből származó alátámasztó adatok.

## VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

### Az állatok száma és a dózisszintek

17. Minden dóziscsoportban legalább négy állatot kell használni, és a vizsgált anyagból legalább három különböző koncentrációt, továbbá párhuzamos negatív kontrollcsoportot, amelyet csak a vizsgált anyaghoz használt vivőanyaggal kezelnek, valamint egy pozitív kontroll csoportot kell alkalmazni (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11-14. bekezdésben foglaltakat). Megfontolandó a pozitív kontroll többféle dózisának vizsgálata, különösen, ha a pozitív kontroll vizsgálatát időszakosan végzik. A kontrollcsoportban lévő állatokkal ugyanúgy kell bánni és dolgozni, mint a kezelt csoportokban lévőkkel, azzal a kivétellel, hogy az állatokat nem kezelik a vizsgált anyaggal.

18. A dózist és a vivőanyagot a (3) és (5) számú hivatkozásokban megadott ajánlások alapján kell kiválasztani. Az egymás utáni dózisos kiválasztása általában megfelelő koncentrációsorból, például 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % stb. történik. Az alkalmazott koncentrációsor megfelelő tudományos megfontolások alapján kell kiválasztani. A három egymás utáni koncentráció kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált anyagról esetlegesen rendelkezésre álló valamennyi toxikológiai információt (például akut toxicitást és bőrritációt), valamint szerkezeti és fizikokémiai adatot, hogy a legmagasabb koncentrációval a lehető legnagyobb expozíciót idézzük elő, amely még nem okoz szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű lokális bőrritációt (3) (25). Ilyen jellegű információk hiányában szükséges lehet a megelőző előszűrő vizsgálat (lásd a 21-24. bekezdést).
19. A vivőanyagot nem szabad megzavarnia vagy befolyásolnia a vizsgálat eredményét, és aszerint kell kiválasztani, hogy a vizsgált anyag oldhatósága a lehető legnagyobb koncentráció elérése érdekében maximális legyen, ugyanakkor a vizsgált anyag felvitelére alkalmas oldatot/szuszpenziót kapjunk. A javasolt vivőanyagok az aceton:olívaolaj (4:1, v/v) keveréke, N,N-dimetilformamid, metil-etil-ke-ton, propilén-glikol és dimetil-szulfoxid (19), de megfelelő tudományos indoklás esetén más vivőanyagok is alkalmazhatók. Bizonyos esetekben további kontrollként szükséges lehet valamely klinikai szempontból releváns oldószer használata, vagy annak a kereskedelmi formulának az alkalmazása, amelyben a vizsgált anyagot forgalomba hozzák. Különösen vigyázni kell arra, hogy megfelelő szolubilizáló szerek (pl. 1 % Pluronic® L92) alkalmazásával a hidrofíl vizsgált anyagokat olyan vivőanyagrendszerbe építsük be, amely benedvesíti a bőrt, de nem folyik le azonnal. A teljesen vizes alapú vivőanyagokat tehát kerülni kell.
20. A nyirokcsomók egyenként történő feldolgozása lehetővé teszi az egyedek közötti variabilitás, valamint a vizsgált anyaggal és a vivőanyaggal kezelt csoport eredményeinek statisztikai összehasonlítását (lásd a 35. bekezdést). Emellett akkor lehet értékelni, hogy lehetséges-e csökkenteni a pozitív kontrollcsoportban lévő egerek számát, ha az egyedi állatokra vonatkozóan gyűjtünk adatokat (12). Ezen túlmenően, egyes szabályozó hatóságok is megkövetelik az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtést. Egyes szabályozó hatóságok azonban esetleg elfogadhatónak tartják az állatokra vonatkozó összesítve gyűjtött adatokat, és ezekben az esetekben, a felhasználók eldöntetik, hogy egyenként vagy összesítve kívánják-e gyűjteni a kísérleti állatokra vonatkozó adatokat.

### Előszűrő vizsgálat

21. A legmagasabb vizsgálandó dózis meghatározását lehetővé tevő információ hiányában (lásd a 18. bekezdést) az LLNA módszerhez alkalmazandó megfelelő dózisszint megállapítása érdekében előszűrő vizsgálatot kell végezni. Az előszűrő vizsgálat célja, hogy támpontot adjon az LLNA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózis kiválasztásához, amennyiben a szisztémás toxicitást (lásd a 24. bekezdést) és/vagy nagyfokú bőrritációt (lásd a 23. bekezdés) okozó koncentrációra vonatkozó információk nem állnak rendelkezésre. Folyadékok esetében a legmagasabb vizsgált dózissal 100 %-os koncentrációnak kell lennie, szilárd anyagok vagy szuszpenziók esetében pedig a lehetséges maximális koncentrációnak.
22. Az előszűrő vizsgálatot a fő LLNA vizsgálatához hasonló körülmények között kell elvégezni, eltekintve attól, hogy a nyirokcsomó proliferációt nem kell értékelni, valamint dóziscsoportonként kevesebb állat használható. Dóziscsoportonként egy vagy két állat javasolt. Az egereket a szisztémás toxicitás, illetve az alkalmazás helyén fellépő helyi irritáció jeleinek szempontjából naponta megfigyelik. A testtömeget a vizsgálat előtt és az állat exterminálása előtt is (6. nap) feljegyzik. A bőrpírt az egerek mindkét fülén vizsgálják és pontozzák az 1. táblázat (25) szerint. A fülvastagság értékeit egy vastagságmérővel (például digitális mikrométer, vagy Peacock Dial vastagságmérő) állapítják meg az 1. napon (az adagolás előtt), a 3. napon (hozzávetőleg 48 órával az első dózis után), valamint a 6. napon. A 6. napon a fülvastagságot ezen kívül a fülből lyukasztással eltávolított szövet tömegének meghatározásával is meg lehet állapítani, amit az állat exterminálása után kell elvégezni. Nagyfokú helyi bőrritációnak minősül a legalább  $\geq 3$ -as pontszámú bőrpír és/vagy legalább  $\geq 25$  %-os fülvastagság-növekedés a vizsgálat bármely napján (26) (27). A fő LLNA vizsgálatához azt a dózist kell maximális dózisként választani, amely az előszűrés során alkalmazott koncentrációsorban (lásd a 18. bekezdést) a szisztémás toxicitást és/vagy nagyfokú helyi bőrritációt okozó koncentrációnál eggyel alacsonyabb.

1. táblázat

### Bőrpír (erythema) pontszámai

Megfigyelés	Pontszám
Nincs erythema	0
Nagyon enyhe erythema (alig észlelhető)	1
Jól körülírt erythema	2
Közepes-súlyos erythema	3
Súlyos (céklavörös elszíneződés), pörkképződéig terjedő erythema, amely lehetetlenné teszi az erythema besorolását	4

23. A 25 %-os fülvastagság-növekedésén felül (26) (27), a bőrirritáló anyagok LLNA módszerrel végzett kimutatásához a kezelt állatok fülvastagságának kontrollcsoporthoz viszonyított statisztikailag szignifikáns növekedését is használják (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Noha 25 % alatti fülvastagság esetén is előfordulhat statisztikailag szignifikáns növekedés, a nagyfokú irritációval azonban ezt különösen nem hozták összefüggésbe (30) (32) (33) (34).
24. Az integrált értékelés részeként alkalmazva a következő klinikai tünetek jelezhetnek szisztémás toxicitást (35) (36), és ezáltal kijelölhetik a fő LLNA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózist: az idegrendszer működésében bekövetkező változások (például piloerekción, ataxia, tremorok és görcsrohamok); a viselkedésben bekövetkező változások (például agresszivitás, a tisztálkodási tevékenységekben bekövetkező változás, az aktivitási szint jelentős változása); a légzési mintázat változása (például a légvételek gyakoriságában és az intenzitásában bekövetkező változás, úgymint dyspnoe, zihálás és szörtyözörejek), valamint változások az táplálék- és vízfogyasztásban. Az értékelés során emellett figyelembe kell venni a letargia és/vagy reakciókészség hiányának jeleit, valamint az enyhénél és pillanatnyinál fokozottabb fájdalom vagy szenvedés bármilyen klinikai tünetét, az > 5 %-nál nagyobb arányú testtömegcsökkenést az 1. naptól a 6. napig tartó időszakban, valamint a mortalitást. Az elhullásközeli állapotban lévő, egyértelműen fájdalmat érző vagy súlyos, tartós szenvedés jeleit mutató állatokat humánus módon exterminálni kell (37).

#### A fő vizsgálat kísérleti ütemterve

25. A vizsgálat kísérleti ütemterve a következő:

- 1. nap: Külön meg kell határozni, és fel kell jegyezni mindegyik állat testtömegét és az esetleges klinikai megfigyeléseket. Vigyünk fel 25 µl térfogatú, megfelelő hígítású vizsgált anyagot, valamint a vívőanyagot önmagában vagy pozitív kontrollt (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11–15. bekezdésekben foglaltakat) a fülek dorzális oldalára.
- 2. és 3. nap: Ismételjük meg az 1. napon elvégzett felvételi eljárást.
- 4. és 5. nap: Nincs kezelés.
- 6. nap: Jegyezzük fel az állatok testtömegét. Injekciózzunk 250 µl steril 20 µCi ( $7,4 \times 10^5$  Bq)  $^3\text{H}$ -metil-timidint tartalmazó sós foszfátpuffert (PBS) a kezelt és kontrollegerek farokvénájába. Használhatunk ehelyett 250 µl, steril 2 µCi ( $7,4 \times 10^4$  Bq)  $^{125}\text{I}$ -jóddeoxiuridint és  $10^{-5}$  M fluorodeoxiuridint tartalmazó PBS-t is, szintén az eregek farokvénájába injektálva. Öt órával később extermináljuk az állatokat. Mindegyik kísérleti csoportban az állatok füléből vágjuk ki a kezelt terület nyirokelvezetéséről gondoskodó fül nyirokcsomókat, és minden egyes állat esetében egyenként helyezzük PBS-be (egyedi állatokon alapuló megközelítés); vagy tegyük a mintákat kísérleti csoportonként egy PBS-t tartalmazó edénybe (kezelési csoportokon alapuló összevont megközelítés). A nyirokcsomók azonosításának és preparálásának részletei és az ehhez kapcsolódó ábrákat a (12) hivatkozásban találhatók. A helyi bőrreakció fő vizsgálatban történő további monitorozásához olyan további paramétereket lehet belevenni a vizsgálati protokollba, mint például a bőrpír pontozása vagy a fülvastagság mérése (akár vastagságmérővel, akár elölés utáni fül darabsúly-meghatározással).

#### A sejtuszpenziók elkészítése

26. Az egyedi állatokon alapuló vagy kezelési csoporton alapuló összevont megközelítést alkalmazva, az egyes állatokból két oldalról vett nyirokcsomósejtekből (LNC) álló egysejtuszpenziókat kell előállítani a sejtek 200 mikrométeres lyukméretű rozsdamentes acélból készült fémhálón keresztül vagy egyéb elfogadható módszerrel történő óvatos mechanikai szétválasztásával. A nyirokcsomósejteket nagy feleslegben lévő PBS-sel kétszer át kell mosni, majd a DNS-t 4 °C-on 18 órán át, 5 %-os triklórecetsavval (TCA) precipitálni (3). A pelleteket vagy 1 ml TCA-ban újra kell szuszpendálni és 10 ml szcintillációs folyadékot tartalmazó szcintillációs fiolákba ( $^3\text{H}$ -számlálás) áttenni, vagy közvetlenül gammaszámláló csövekbe ( $^{125}\text{I}$ -számlálás) kell átrakni.

#### A sejtproliferáció meghatározása (beépült radioaktivitás)

27. A  $^3\text{H}$ -metil-timidin beépülését a  $\beta$ -scintillációs beütésszámmal mérik, percenkénti bomlás (DPM) egységekben. A  $^{125}\text{I}$ -jóddeoxiuridin beépülését a  $^{125}\text{I}$  beütésszámmal mérik, és ugyancsak DPM-ben fejezik ki. Az alkalmazott megközelítéstől függően a beépülést DPM/egér (egyedi állatokon alapuló megközelítés) vagy DPM/kezelési csoport (kezelési csoporton alapuló összevont megközelítés) egységben fejezik ki.

#### Csökkentett LLNA (rLLNA)

28. Bizonyos esetekben, amikor a szabályozási előírásoknak megfelelően igazolni kell a bőrszenzibilizáló képesség feltételezett hiányát, opcionális rLLNA protokoll alkalmazható (16) (17) (18), amelyhez kevesebb állatot kell felhasználni, azzal a feltétellel, hogy a vizsgálati módszer e leírásában foglalt, az LLNA protokolljában szereplő összes egyéb előírást betartják. Az rLLNA módszer alkalmazása előtt egyértelműen meg kell indokolni annak alkalmazását, és ismertetni kell az alkalmazást alátámasztó tudományos magyarázatot. Amennyiben a módszer pozitív vagy kétes eredményt ad, további vizsgálatokra lehet szükség az eredmény értelmezéséhez és tisztázásához.

29. Az LLNA és az rLLNA vizsgálati módszerek protokolljai között az egyetlen különbség a dóziscsoportok kisebb száma az rLLNA esetében, ennél fogva az rLLNA módszer nem szolgáltat adatokat a dózis-válasz összefüggésre vonatkozóan. Az rLLNA módszer ezért nem alkalmazható olyan esetekben, amikor a dózis-válasz összefüggésre vonatkozó információkra van szükség. A több dózist alkalmazó LLNA módszerhez hasonlóan az rLLNA módszer során a vizsgált anyagból alkalmazott maximális koncentrációt úgy kell megválasztani, hogy az ne idézzen elő az egérnél kifejezett szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű helyi bőrirritációt (lásd a 18. bekezdést).

#### MEGFIGYELÉSEK

##### Klinikai megfigyelések

30. Naponta legalább egyszer minden egérnél meg kell vizsgálni az alkalmazás helyén kialakuló lokális vagy szisztémás toxicitás esetleges tüneteit. Minden megfigyelést szisztematikusan fel kell jegyezni minden egyes egér esetében, egyedi adatsor felvételével. A monitoring tervnek tartalmaznia kell azon kritériumokat, amelyek alapján azonnal azonosíthatók az eutanáziát igénylő, szisztémás toxicitást, kiterjedt helyi bőrirritációt vagy bőrkorróziót mutató egerek (37).

##### Testtömeg

31. Ahogyan az a 25. bekezdésben szerepel, az egyes állatok testtömegét a vizsgálat kezdetén, valamint a humánusan történő exterminálás tervezett időpontjában kell megmérni.

#### AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

32. Az egyes kezelési csoportokra vonatkozó eredményeket stimulációs indexben (SI) fejezzük ki. Az egyedi állatokon alapuló megközelítés alkalmazása esetén, akkor az SI kiszámítása úgy történik, hogy a vizsgált anyaggal kezelt egyes csoportokban és a pozitív kontrollcsoportban kapott állatonkénti átlagos DPM-értéket el kell osztani az oldószerrel/vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport átlagos állatonkénti DPM-értékével. A vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportok átlagos SI-értéke tehát 1. A kezelési csoportokon alapuló összevont megközelítésének alkalmazása esetén az SI-t úgy kapják meg, hogy az egyes kezelési csoportokra eső összevont radioaktív beépülést elosztják a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportra jutó összevont beépüléssel, ami megadja az átlagos SI-t.
33. A válaszreakciót akkor lehet pozitívan értékelni, ha a stimulációs index legalább  $\geq 3$ . Amikor azonban azt kell meghatározni, hogy egy határértéken lévő eredmény pozitívnak tekintendő-e, akkor a dózis-válasz összefüggés erőssége, a statisztikai szignifikancia és az oldószerrel/vivőanyaggal, valamint a pozitív kontrollal kapott válaszreakciók következetessége is felhasználható (4)(5)(6).
34. Ha a kapott eredmények tisztázást igényelnek, figyelembe kell venni a vizsgált anyag különféle tulajdonságait, és ezen belül azt is, hogy mutat-e szerkezeti rokonságot ismert bőrszenzibilizáló anyagokkal, okoz-e erőteljes helyi bőrirritációt egereknél, illetve hogy milyen a megfigyelt dózis-válasz összefüggés. Ezek, illetve további megfontolások részletesebb tárgyalását lásd a (7) hivatkozásban.
35. A radioaktivitási adatok egyes egerekre vonatkozó gyűjtése lehetővé teszi a dózis-válasz összefüggés adatokban tükröződő fennállásának és mértékének statisztikai elemzését. Bármely statisztikai elemzés tartalmazhatja a dózis-válasz összefüggés értékelését, valamint a vizsgálati csoportok megfelelően korrigált összehasonlításait (például a dóziscsoportok páronkénti összehasonlítása a párhuzamos, vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokkal). A statisztikai elemzésekben a dózis-válasz tendenciák értékelésénél szerepelhet például lineáris regresszió vagy Williams-féle próba, a páronkénti összehasonlításoknál pedig Dunnett-féle próba. A megfelelő statisztikai elemzési módszer kiválasztásakor a vizsgálónak figyelemmel kell lennie a lehetséges varianciaegyenlenségekre és más kapcsolódó problémákra, amelyek miatt az adatok transzformációjára vagy nem paraméteres statisztikai elemzésre lehet szükség. A vizsgálónak minden esetben el kell végeznie az SI-k kiszámítását és statisztikai elemzéseket bizonyos adatpontokkal (az úgynevezett »kiugró adatokkal») és azok nélkül.

#### ADATOK ÉS JELENTÉS

##### Adatok

36. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni. Az egyedi állatokon alapuló megközelítés alkalmazása esetén, ki kell mutatni az egyedi DPM-értéket, a csoport átlagos DPM/állat értékeit, az ehhez tartozó hiba értékeket (pl. SD, SEM), valamint az egyes dóziscsoportokra vonatkozó átlagos SI értéket összevetve a megfelelő, vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport értékével. A kezelési csoportokon alapuló összevont megközelítésének alkalmazása esetén az egyes dóziscsoportoknál ki kell mutatni az átlagos/medián DMP és átlagos stimulációs index értékét összehasonlítva a megfelelő vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport értékével.

##### Vizsgálati jelentés

37. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyagok és kontrollanyagok:

- azonosító adatok (pl. adott esetben a CAS-szám és az EU-szám; eredet; tisztaság; ismert szennyezők; tétel-szám),
- fizikai megjelenés és fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. illékonyaság, stabilitás, oldhatóság),

- elegy esetén annak összetétele és az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya,

Oldószer/vivőanyag:

- azonosító adatok (adott esetben tisztaság; koncentráció; alkalmazott térfogat,
- a vivőanyag kiválasztásának indoklása.

Kísérleti állatok:

- CBA egértörzs származása,
- az állatok mikrobiológiai státusa, amennyiben ismert,
- az állatok száma és életkora,
- az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.,

Vizsgálati körülmények:

- a vizsgált anyagból előállított készítménnyel és annak alkalmazásával kapcsolatos adatok,
- a dózisszintek megválasztásának indoklása (ezen belül adott esetben az előszűrési vizsgálatok eredményei),
- a vivőanyag és a vizsgált anyag alkalmazott koncentrációja, valamint a vizsgált anyagból alkalmazott teljes mennyiség,
- a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete),
- a kezelés adatai és a mintavételek ütemezése,
- a toxicitás mérésére alkalmazott módszerek,
- a pozitív és negatív vizsgálati eredmény kimondásának kritériumai,
- a protokolltól való esetleges eltérések adatai, és annak kifejtése, hogy az eltérés hogyan érintheti vizsgálati tervet és az eredményeket,

A megbízhatóság ellenőrzése:

- a legutóbbi megbízhatósági ellenőrzés eredményeinek összefoglalása az alkalmazott anyag, koncentráció és vivőanyag adataival együtt,
- a vizsgálólaboratórium párhuzamosan és/vagy korábban vizsgált pozitív és párhuzamosan vizsgált negatív kontrollokra vonatkozó adatai,
- ha nem vizsgáltak párhuzamosan pozitív kontrollt, a laboratóriumban legutóbb végzett időszakos pozitív kontroll dátuma és laboratóriumi jelentése, valamint pozitív kontroll vizsgálatának korábbi adatait részletező jelentés, amely indokolja, hogy miért nem végzik a laboratóriumban pozitív kontroll párhuzamos vizsgálatát,

Eredmények:

- az egyes állatok testtömege a kezelés kezdetén és az exterminálás tervezett időpontjában, illetve az átlagos és vonatkozó hibamutatók (pl. SD, SEM) kezelési csoportonként,
- a toxicitási tünetek, ezen belül az alkalmazás helyén esetleg kialakuló bőrirritáció megjelenésének időpontja és időbeli alakulása minden egyes állatra vonatkozóan,
- az egy egérré vonatkozó (egyedi állatokon alapuló megközelítés) és az átlagos (kezelési csoportokon alapuló összevont megközelítés) DPM-értékek és SI-értékek kezelési csoportonkénti táblázata,

- átlagos és kapcsolódó hibamutatók (pl. SD, SEM) az állatonkénti DPM-értékek esetében, az egyes kezelés csoportokban, és a kiugró értékek elemzése az egyes kezelési csoportokban, amennyiben az egyedi állatokon alapuló megközelítést alkalmazzuk,
- a kiszámított SI és a variabilitás megfelelő mutatója, amely az egyedek közti variabilitást a vizsgált anyaggal kezelt csoportban és a kontrollcsoportokban egyaránt figyelembe veszi, amennyiben az egyedi állatokon alapuló megközelítést alkalmazzuk,
- dózis-válasz összefüggés,
- adott esetben statisztikai elemzések,

Az eredmények tárgyalása:

- rövid kommentár az eredményekhez, a dózis-válasz elemzéshez és adott esetben a statisztikai elemzésekhez, és következtetés levonása arra vonatkozóan, hogy a vizsgált anyagot bőrszenzibilizáló hatásúnak kell-e tekinteni vagy sem.

#### SZAKIRODALOM

- (1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165-169.
- (3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- (7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.
- (8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 258-273.
- (10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274-286.
- (11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 249-257.
- (12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf)]
- (13) OECD (1992), Skin Sensitisation. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

- (14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284.
- (16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.
- (17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Elektronikus formátumban: [[http://ecvam.jrc.it/ft\\_doc/ESAC26\\_statement\\_rLLNA\\_20070525-1.pdf](http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf)]
- (18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICE-ATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna/llnarep.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf)]
- (20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Elektronikus formátumban: [http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)
- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>]

- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acuteTox/Tox\\_workshop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acuteTox/Tox_workshop.htm)
- (37) 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 Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

### 1. függelék

## Teljesítményszabványok a bőrszenzibilizáció vizsgálatára javasolt hasonló vagy módosított LLNA vizsgálati módszerek értékeléséhez

### BEVEZETÉS

1. A teljesítményszabványok (PS) célja annak ismertetése, hogy milyen alapon lehet egy vizsgálati módszerről – akár védett (például szerzői joggal védett, védjeggyel ellátott, bejegyzett), akár nem védett módszerről – megállapítani, hogy adott vizsgálati célokra kellő pontossággal és megbízhatósággal rendelkezik-e. Ezek a hitelesített és elfogadott vizsgálati módszereken alapuló teljesítményszabványok a hasonló tudományos elvekre és mérésre épülő, illetve azonos biológiai vagy toxikus hatást előrevetítő módszerek (köznap elnevezéssel »me-too« vizsgálatok) megbízhatóságának és pontosságának értékelésére alkalmazhatók (14).
2. A módosított módszerek (például tervezett esetleges javítás egy jóváhagyott vizsgálati módszeren) alkalmazása előtt értékelést kell végezni annak meghatározására, hogy a tervezett változtatások milyen hatást gyakorolnak a vizsgálat teljesítményére, és milyen mértékben befolyásolják a hitelesítési folyamat egyéb összetevőiről rendelkezésre álló információkat. A tervezett változtatások számától és jellegétől, valamint a változtatásokra vonatkozóan keletkezett adatoktól és alátámasztó dokumentációtól függően, ezeket vagy az új vizsgálatokra előírtakkal megegyező hitelesítési eljárásnak, vagy – amennyiben ez lehetséges – a megállapított teljesítményszabványban foglalt korlátozott megbízhatósági és relevanciaértékelésnek kell alávetni (14).
3. Az e vizsgálati módszer alapján alkalmazásra javasolt hasonló vagy módosított eljárásokat megbízhatóságuk és pontosságuk meghatározása érdekében az LLNA-pontértékek teljes tartományát képviselő vegyi anyagok felhasználásával kell értékelni. Állatok indokolatlan felhasználásának elkerülése érdekében kifejezetten ajánlott, hogy a modell kifejlesztői, mielőtt a teljesítményszabványban és a vizsgálati módszer e leírásában adott útmutatásnak megfelelően megkezdik a hitelesítési vizsgálatokat, egyeztessenek az illetékes hatóságokkal.
4. Ezek a teljesítményszabványok az LLNA hasonló vagy módosított változatainak értékelésére szolgáló US-ICCVAM, EC-ECVAM és Japanese-JaCVAM harmonizált teljesítményszabványokon alapulnak (12). A teljesítményszabvány tartalmazza a vizsgálati módszer alapvető összetevőit, az ajánlott referenciaanyagokat, valamint a pontosság és megbízhatóság azon szabványos értékeit, amelyet a javasolt módszernek el kell érnie, vagy meg kell haladnia.

### I. A vizsgálati módszer alapvető összetevői

5. Annak biztosítására, hogy a hasonló vagy módosított LLNA módszer funkcionális és mechanikai szempontból megegyező legyen az LLNA-val, és ugyanazt a biológiai hatást mérje, a vizsgálati módszer protokolljában a következő összetevőknek kell szerepelniük:

- a vizsgált anyagot helyileg kell felvinni az egér mindkét fülére,
- a limfocitaproliferációt a vizsgált anyag alkalmazásának területéről elvezető nyirokcsomókban kell mérni,
- a limfocitaproliferációt a bőrszenzibilizáció indukciós fázisában kell mérni,
- a vizsgált anyagból alkalmazott maximális koncentrációt úgy kell megválasztani, hogy az ne idézzen elő az egéرنél szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű helyi bőrirritációt. Pozitív referenciaanyagok esetében a legmagasabb dózisnak el kell érnie legalább az adott referenciaanyag LLNA EC3 értékét (lásd az 1. táblázatot), ami még nem idéz elő az egéرنél szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű helyi bőrirritációt,
- minden vizsgálat során alkalmazni kell párhuzamos negatív kontrollt, és adott esetben párhuzamos pozitív kontrollt is,
- dóziscsoportonként legalább négy állatot kell használni,
- az állatok adatai egyénileg vagy összesítve is gyűjthetők.

Amennyiben e feltételek bármelyike nem teljesül, akkor ezek a teljesítményszabványok a hasonló vagy módosított módszer hitelesítésére nem alkalmazhatók.

### II. A referenciaanyagok minimális listája

6. Az US-ICCVAM, EC-ECVAM és a Japanese-JaCVAM harmonizált teljesítményszabvány (12) az LLNA teljesítményszabványában 18 minimálisan alkalmazandó referenciaanyagot, valamint négy opcionális referenciaanyagot azonosít (ezek például olyan anyagok, amelyek az LLNA-vizsgálatban álpozitív vagy álnegatív eredményt adtak a humán és a tengerimalacokon végzett vizsgálatokkal összehasonlítva [B.6. fejezet vagy az OECD 406. vizsgálati iránymutatása] (13), ezért lehetőséget biztosítanak az LLNA vizsgálatával egyenértékű vagy jobb teljesítmény igazolására). E vegyi anyagok kiválasztása során a következő kritériumokat vették figyelembe:

- a referenciaanyagok listája megfelelt a bőrszenzibilizáció hatás szempontjából általában vizsgált anyagok típusainak, valamint az LLNA-val mérhető vagy előre jelezhető válaszreakciók tartományának,
- az anyagok jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek,
- mindegyik anyagról rendelkezésre álltak tengerimalacokon végzett vizsgálatokból (B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (13) és (lehetőség szerint) humán vizsgálatokból származó LLNA-adatok, valamint
- az anyagok kereskedelmi forrásból azonnal elérhetőek voltak.

Az ajánlott referenciaanyagok felsorolása az 1. táblázatban található. Az ajánlott referenciaanyagok alkalmazásával végzett vizsgálatokat annál a vivőanyagnál kell értékelni, amellyel együtt az 1. táblázatban szerepelnek. Amennyiben a listában szereplő anyag esetleg nem áll rendelkezésre, akkor megfelelő indoklással az említett kiválasztási kritériumoknak megfelelő egyéb anyagok is használhatók.

1. táblázat

## Az LLNA teljesítményszabványhoz javasolt referenciaanyagok

Sorszám	Vegyvi anyagok (1)	CAS-szám	Halmazállapot	Vivő (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Tényleges EC3-tartomány	LLNA vs. tengerimalac	LLNA vs. humán
1	5-klór-2-metil-4-izotiazolin-3-on (CMI)/2-metil-4-izotiazolin-3-on (MI) (5)	26172-55-4/2682-20-4	Foly.	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NSZ	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Szil.	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-feniléndiamin	106-50-3	Szil.	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Kobalt-klorid	7646-79-9	Szil.	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Izoeugenol	97-54-1	Foly.	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Szil.	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NSZ	+/+	+/+
7	Citrál	5392-40-5	Foly.	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Foly.	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Foly.	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Fenil-benzoát	93-99-2	Szil.	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Cinnamil-alkohol	104-54-1	Szil.	AOO	21	1	10,5-42	NSZ	+/+	+/+
12	Imidazolidinil-urea	39236-46-9	Szil.	DMF	24	1	12-48	NSZ	+/+	+/+
13	Metil-metakrilát	80-62-6	Foly.	AOO	90	1	45-100	NSZ	+/+	+/+
14	Klórbenzol	108-90-7	Foly.	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/ (*)
15	Izopropanol	67-63-0	Foly.	AOO	50	1	NA	NA	-/-	-/+
16	Tejsav	50-21-5	Foly.	DMSO	25	1	NA	NA	-/-	-/ (*)
17	Metil-szalicilát	119-36-8	Foly.	AOO	20	9	NA	NA	-/-	-/-
18	Szalicilsav	69-72-7	Szil.	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/-

Sorszám	Vegyí anyagok <sup>(1)</sup>	CAS-szám	Halmazállapot	Vivő <sup>(2)</sup>	EC3 % <sup>(3)</sup>	N <sup>(4)</sup>	0,5x – 2,0x EC3	Tényleges EC3-tartomány	LLNA vs. tengerimalac	LLNA vs. humán
Opcionális anyagok az LLNA-hoz viszonyított jobb teljesítmény igazolásához										
19	Nátrium-lauril-szulfát	151-21-3	Szil.	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/-	+/-
20	Etilén-glikol-dimetakrilát	97-90-5	Foly.	MEK	28	1	14-56	NSZ	+/-	+/+
21	Xilol	1330-20-7	Foly.	AOO	95,8	1	47,9-100	NSZ	+/ <sup>(**)</sup>	+/-
22	Nikkel-klorid	7718-54-9	Szil.	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

Rövidítések: AOO = aceton: olívoajaj (4:1, v/v); CAS-szám = Chemical Abstracts Service szám; DMF = N,N-dimetilformamid; DMSO = dimetil-szulfoxid; DNCB = 2,4-dinitroklórbenzol; EC3 = 3-as stimulációs index előidézéséhez szükséges becsült koncentráció; GP = tengerimalacon végzett vizsgálat eredménye (lásd B. 6. vagy az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (13); HCA = hexil-cinnamaldehyd; Foly. = folyadék; LLNA = murin lokális nyirokcsomó-vizsgálat eredménye (lásd B.42. vagy az OECD 429. vizsgálati iránymutatása) (2); MEK = metil-etil-keton; NA = nem alkalmazható, mivel a stimulációs index < 3; NSZ = nem került kiszámításra, mert az adatok egyetlen vizsgálatból származnak; Szil. = szilárd; Vivő, = a vizsgálathoz alkalmazott vivőanyag.

(\*) Embereknél feltételezhetően nem okoz szenzibilizációt, mivel klinikai epikután (patch) teszt eredmények nem voltak fellelhetők, nem szerepel az epikután vizsgálati készletekben allergénként, továbbá humán szenzibilizációról szóló esettanulmány nem lelhető fel.

(\*\*) Tengerimalacokra vonatkozó adatok nem állnak rendelkezésre.

(1) A vegyi anyagokat aznap kell elkészíteni, kivéve, ha stabilitási adatok igazolják, hogy a tárolás elfogadható.

(2) A különböző vivőanyagok LLNA vizsgálat teljesítményére gyakorolt potenciális hatása miatt az egyes referenciaanyagokhoz ajánlott vivőanyagot kell használni (24) (32).

(3) Átlagérték, ahol több EC3-érték is rendelkezésre állt. Negatív anyagoknál (3-as alatti stimulációs index) a legmagasabb vizsgált koncentráció van megadva.

(4) Az adatok forrásául szolgáló LLNA-vizsgálatok száma.

(5) Kereskedelemben kapható Kathon CG néven (CAS-szám: 55965-84-9), ami CMI és MI 3:1 arányú keveréke. Az egyes összetevők relatív koncentrációja a 1,1-1,25 %-os (CMI) és 0,3-0,45 %-os (MI) tartományban mozog. Inaktív összetevők a magnéziumsók (21,5-24 %) és a réz-nitrát (0,15-0,17 %), a fennmaradó rész pedig 74-77 % víz. A Kathon CG könnyen beszerezhető a Sigma-Aldrich and Rohm and Haas (jelenleg Dow Chemical Corporation) cégtől.

### III. A megbízhatóságra és pontosságra vonatkozóan meghatározott szabványok

7. A hasonló vagy módosított LLNA módszerek pontosságának a minimálisan alkalmazandó 18 referenciaanyaggal vizsgálva el kell érnie vagy meg kell haladnia az LLNA teljesítményszabványában meghatározott pontosságot. Az új vagy módosított módszernek »igen/nem« döntés alapján a vizsgált anyag helyes besorolását kell eredményeznie. Az új vagy módosított módszernek ugyanakkor nem feltétlenül kell az összes minimálisan alkalmazandó referenciaanyagot helyesen besorolnia. Ha például a vizsgálat a gyengén szenzibilizáló anyagok egyikét esetleg nem megfelelően sorolná be, akkor a hibás besorolás elméleti alapjait, valamint megfelelő kiegészítő adatokat (például olyan vizsgálati eredményeket, amelyek alapján a hibásan besorolt referenciaanyagéhoz hasonló fizikai, kémiai és szenzibilizáló jellemzőkkel rendelkező egyéb anyagok besorolása helyesen történt) figyelembe lehetne venni az egyenértékű teljesítmény bizonyítása érdekében. Ilyen körülmények között az új vagy módosított LLNA vizsgálati módszer hitelesítési státusának értékelése eseti alapon történne.

#### Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság

8. A laboratóriumon belül reprodukálhatóság meghatározásához az új vagy módosított LLNA módszert az LLNA-vizsgálatban jól jellemzett szenzibilizáló anyag használatával kell értékelni. Ezért az LLNA teljesítményszabvány a hexil-cinnamaldehyd (HCA) ismételt vizsgálataiból származó eredmények variabilitásán alapul. A laboratóriumon belüli megbízhatóság értékeléséhez négy külön alkalommal, a vizsgálatok között legalább egy hetes időszakot hagyva meg kell határozni a HCA-ra vonatkozó becült koncentrációkűszöb (ECT) értékeit. Akkor elfogadható a laboratóriumon belüli reprodukálhatóság, ha a laboratórium a HCA mindegyik vizsgálatán során 5 % és 20 % közötti ECT-értékeket kap, amelyek a HCA-ra vonatkozóan az LLNA-vizsgálatban meghatározott átlagos EC3 (10 %) 0,5–2,0-szeresének felelnek meg (lásd az 1. táblázatot).

#### Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság

9. Az új vagy módosított LLNA módszer laboratóriumok közötti reprodukálhatóságát az LLNA-vizsgálatban jól jellemzett két szenzibilizáló anyag használatával kell értékelni. Ezért az LLNA teljesítményszabványa a HCA és a 2,4-dinitroklórbenzol (DNCB) különböző laboratóriumokban végzett vizsgálataiból származó eredmények variabilitásán alapul. Az ECT-értékeket függetlenül, legalább három külön laboratóriumban végzett azonos vizsgálat alapján kell kiszámítani. Akkor igazolható a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, ha a HCA-ra mindegyik laboratórium 5 % és 20 % közötti, a DNCB-re pedig 0,025 % és 0,1 % közötti ECT-értékeket kap, amelyek az LLNA-vizsgálatban a HCA-ra (10 %), illetve a DNCB-re (0,05 %) vonatkozóan meghatározott átlagos EC3-koncentráció 0,5–2,0-szeresének felelnek meg (lásd az 1. táblázatot).

### 2. függelék

#### Fogalommeghatározások

**Pontosság:** A vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az »egyezés« megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (14).

**Referenciaanyag:** A vizsgált anyaggal való összehasonlítás céljából etalonként használt szenzibilizáló vagy nem szenzibilizáló anyag. A referenciaanyaggal szemben a következő elvárások fogalmazhatók meg: i. állandó és megbízható beszerzési forrásból vagy forrásokból kell származnia; ii. a vizsgált anyagok csoportjához hasonló szerkezettel és funkcionalitással kell rendelkeznie; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állniuk az anyag ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v. a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

**Becsült koncentrációkűszöb (ECT):** Valamely vizsgált anyag ahhoz szükséges becült koncentrációja, hogy az anyag pozitív válaszreakcióra utaló stimulációs indexet adjon.

**Becsült koncentráció 3 (EC3):** Valamely vizsgált anyag ahhoz szükséges becült koncentrációja, hogy hármas stimulációs indexet adjon.

**Álnegatív:** Valamely vizsgálati módszerrel tévesen negatívnak vagy inaktívnak minősített vizsgált anyag, amely valójában pozitív vagy aktív.

**Álpozitív:** Valamely vizsgálati módszerrel tévesen pozitívnak vagy aktívnak minősített vizsgált anyag, amely valójában negatív vagy inaktív.

**Veszély:** Káros egészségügyi vagy ökológiai hatások előidézésének lehetősége. A káros hatás csak akkor jelenik meg, ha kellő szintű az expozíció.

**Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság:** Annak mértéke, hogy a különböző minősített laboratóriumok azonos protokoll és azonos vizsgált anyagok alkalmazásával mennyire képesek minőségileg és mennyiségileg azonos eredményeket produkálni. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság az előhitelesítési és hitelesítési folyamat során kerül meghatározásra, és annak mértékét jelzi, hogy az adott vizsgálat mennyire sikeresen vihető át laboratóriumok között; más néven laboratóriumok közötti megismételhetőség (14).

**Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság:** Annak meghatározása, hogy az ugyanazon laboratóriumban dolgozó képzett személyek meghatározott protokoll különböző időpontokban történő alkalmazásával mennyire sikeresen tudják reprodukálni az eredményeket. Más néven laboratóriumon belüli megismételhetőség (14).

**Me-too vizsgálat:** Olyan vizsgálati módszerek köznapi elnevezése, amelyek strukturálisan és funkcionálisan hasonlóak egy hitelesített és elfogadott referenciaként szolgáló vizsgálati módszerhez. Az ilyen vizsgálati módszerek esetében megfelelő lehet az úgynevezett »catch-up« (rövidített) hitelesítési eljárás. A hasonló vizsgálati módszer szinonimája (14).

**Kiugró érték:** A kiugró érték olyan megfigyelés, amely szembetűnően eltér az egy populációból vett véletlenszerű minta egyéb értékeitől.

**Teljesítményszabványok (PS):** Hitelesített vizsgálati módszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, funkcionalitás és végrehajtás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a hitelesített vizsgálati módszer elfogadható teljesítményének igazolására alkalmazott vegyi anyagok közül kiválasztott referenciaanyagok minimális listája; valamint iii. a hitelesített vizsgálati módszerrel kapott eredmények alapján az a hasonló szintű pontosság és megbízhatóság, amelyet a javasolt vizsgálati módszernek a referenciaanyagok minimális listájával történő értékeléskor mutatnia kell (14).

**Védett vizsgálati módszer:** Olyan vizsgálati módszer, amelynek esetében az előállítást és a forgalmazást szabadalmak, szerzői jogok, védjegyek stb. korlátozzák.

**Minőségbiztosítás:** Irányítási folyamat, amelynek során a laboratóriumi vizsgálati szabványok és követelmények betartását, a jegyzőkönyvek vezetését, valamint az adattovábbítás pontosságát a vizsgálatot végző személyektől független személyek ellenőrzik.

**Referenciaanyagok:** A hitelesítési eljárás során történő alkalmazásra kiválasztott olyan vegyi anyagok, amelyek esetében már ismert az *in vitro* vagy *in vivo* referencia-vizsgálatrendszerben vagy vizsgált fajnál adott válaszreakció. Ezeknek a vegyi anyagoknak reprezentatívnak kell lenniük arra az anyagcsoportra nézve, amely esetében a vizsgálati módszert várhatóan alkalmazni fogják, és képviselniük kell azon vegyi anyagokra jellemző válaszreakciók teljes tartományát – az erőstől kezdve a gyengén át a negatívig –, amelyek esetében az adott referenciaanyag alkalmazható. A hitelesítési eljárás különböző szakaszaiban, illetve a különböző vizsgálati módszerekhez és vizsgálati alkalmazásokhoz a referenciaanyagok különböző csoportjaira lehet szükség (14).

**Relevancia:** A vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) kell figyelembe venni (14).

**Megbízhatóság:** Azonos protokoll szerint végzett vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóságának mérésére szolgál. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (14).

**Bőrszenzibilizáció:** Immunológiai folyamat, amely akkor jelentkezik, ha egy érzékeny egyén lokálisan érintkezik valamely indukáló hatású allergén vegyi anyaggal, amely esetlegesen kontakt szenzibilizáció kialakulásához vezető immunválaszt vált ki a bőrben.

**Stimulációs index (SI):** Adott vizsgált anyag bőrszenzibilizációt okozó képességének meghatározására kiszámított érték, amely az anyaggal kezelt csoportban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportban tapasztalt proliferáció aránya.

**Vizsgált anyag (más néven vizsgált vegyi anyag):** Bármely anyag vagy keverék, amelyet ezzel a vizsgálati módszerrel vizsgálnak.

**Hitelesített vizsgálati módszer:** Olyan vizsgálati módszer, amely esetében az adott célra történő alkalmazás relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága hitelesítési vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a hitelesített vizsgálati módszerek nem feltétlenül nyújtanak megfelelő teljesítményt a pontosság és megbízhatóság tekintetében ahhoz, hogy egy tervezett alkalmazási célra megfelelőnek minősüljenek (14).”

2. A B.46. fejezet helyébe a következő szöveg lép:

## **„B.46. IN VITRO BŐRIRRITÁCIÓ: REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMON VÉGZETT VIZSGÁLATI MÓDSZER**

### **BEVEZETÉS**

1. A bőrirritáció a vizsgált vegyi anyag alkalmazását követően 4 órán belül megjelenő, visszafordítható bőrkárosodás (az Egyesült Nemzetek Szervezete [ENSZ] által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében [GHS], valamint az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló, 2008. december 16-i 1272/2008/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletében [EU CLP] meghatározottak szerint (1)(3)). Ez a vizsgálati módszer olyan *in vitro* eljárást biztosít, amely lehetővé teszi az ENSZ által kidolgozott GHS és az EU CLP szerinti 2-es kategóriának megfelelő, irritációt okozó anyagok (anyagok és keverékek) jelentette veszély meghatározását (1) (2) (3). Az EU-ban, valamint azokban a régiókban, ahol nem vették át az ENSZ GHS opcionális 3. kategóriáját (enyhén irritáló hatású anyagok), ez a vizsgálati módszer a besorolással nem rendelkező vegyi anyagok, vagyis az ENSZ GHS és az EU CLP szerinti »kategória nélküli« anyagok meghatározására is alkalmazható (1)(3). Ez a vizsgálati módszer a vegyi anyagok bőrirritációt okozó hatásának lépcsőzetes vizsgálati stratégiáján belül az *in vivo* vizsgálatot önállóan helyettesítő vizsgálatként (e melléklet 4. és B.4. fejezete) alkalmazható.

2. A bőrirritáció vizsgálata jellemzően állatkísérletek végzésével jár (az OECD 404. vizsgálati iránymutatása; e melléklet B.4. fejezete) (4). 2004-ben a B.4. fejezet állatjóléti szempontokat figyelembe véve átdolgozásra került, lehetővé téve a bőrkorrózió/bőrirritáció lépcsőzetes vizsgálati stratégia részét képező hitelesített *in vitro* és *ex vivo* vizsgálati módszerek alkalmazásával történő meghatározását, megkímélve ezzel az állatokat a fájdalomtól és szenvedéstől. Három hitelesített *in vitro* vizsgálati módszert fogadtak el és foglaltak bele az OECD 430., 431. és 435. vizsgálati iránymutatásaiba (5) (6) (7), ezek közül két vizsgálati módszert – amelyek e melléklet B.40. és B.40 A. fejezetében szerepelnek – a B.4. fejezet, illetve az OECD 404. vizsgálati iránymutatása lépcsőzetes vizsgálati stratégiájának korrozív hatást vizsgáló részében kell alkalmazni (4).
3. Ez a vizsgálati módszer a bőrirritációval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik. Rekonstruált emberi felhám-(epidermisz)modellen alapul, amely általános felépítését tekintve (sejtforrásként humán eredetű, nem transzformált epidermális keratinsejtek alkalmazása, valamint reprezentatív szövet- és citoarchitektúra) élethűen utánozza az emberi bőr felső rétegének, vagyis a felhámnak (epidermisznek) a biokémiai és fiziológiai tulajdonságait. Ez a vizsgálati módszer több teljesítményszabványt (2. függelék) is magában foglal az EC-ECVAM (8) által kidolgozott hasonló és módosított rekonstruált emberi epidermiszalapú vizsgálati módszereknek az OECD 34. iránymutatásában szereplő elveknek megfelelő értékeléséhez (9).
4. Három olyan módszer van, amelyet e vizsgálati módszer alapján hitelesítettek. Előhitelesítési, optimalizálási és hitelesítési vizsgálatokat végeztek egy emberi felhámmodell alkalmazó *in vitro* módszerhez (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), amely kereskedelmi forgalomban EpiSkin™ (hitelesített referencia-módszer – VRM) néven kapható. A teljesítményszabvány szerinti hitelesítés alapján két másik, szintén kereskedelmi forgalomban kapható, *in vitro* rekonstruált emberi felhámmodellen végzett bőrirritáció-vizsgálati módszer adott a referencia-módszerhez hasonló eredményeket (21): az EpiDerm™ SIT (EPI-200) és a SkinEthic™ RHE módszerek (22).
5. Ahhoz, hogy az *in vitro* rekonstruált emberi felhámmodellen végzett módszerhez hasonló vagy annak egyik változatát képező, de a hitelesített referencia-módszertől, az EpiDerm™ SIT (EPI-200) vagy a SkinEthic™ RHE módszertől eltérő javasolt vizsgálatot szabályozási célokra lehessen alkalmazni, a javasolt alkalmazás tekintetében meg kell határozni annak megbízhatóságát, relevanciáját (pontosságát) és korlátait, hogy a vizsgálatot az e vizsgálati módszerben előírt teljesítményszabványban foglalt követelményeknek megfelelően (2. függelék) az 1. referencia-módszerhez hasonlóan lehessen minősíteni. Továbbá az *in vitro* rekonstruált emberi felhámmodellen alapuló hasonló vagy módosított módszer hatósági engedélyezés céljából történő kidolgozása és hitelesítése előtt javasolt tanulmányozni az OECD által a bőrirritáció *in vitro* vizsgálatára vonatkozóan kiadott magyarázó háttérdokumentumot (23).

#### FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

6. Az alkalmazott fogalmak meghatározása az 1. függelékben található.

#### KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

7. Amint azt a hitelesítési vizsgálat kimutatta (16), a vizsgálati módszer egyik korlátja az, hogy nem teszi lehetővé a vegyi anyagok ENSZ GHS szerinti 3. kategóriába történő besorolását (enyhe bőrirritáló hatású anyag) (1). Részleges helyettesítő vizsgálatként alkalmazva *in vivo* kontrollteszt válhat szükségessé a bőrirritáló hatás teljes jellemzéséhez (e melléklet 4. és B.4. fejezete). Elfogadott tény, hogy az emberi bőr használatára nemzeti és nemzetközi etikai megfontolások és feltételek vonatkoznak.
8. Ez a vizsgálati módszer a B.4. fejezetben szereplő (az OECD 404. vizsgálati iránymutatása), bőrkorrózióra/bőrirritációra irányuló lépcsőzetes vizsgálati stratégia *in vitro* bőrirritációs részével foglalkozik (4). Bár ez a vizsgálati módszer nem nyújt megfelelő információt a bőrkorrózióról, megjegyzendő, hogy a bőrkorrózió vizsgálatára irányuló B.40 A. módszer (az OECD 431. vizsgálati iránymutatása) ugyanezen a rekonstruált emberi felhámmodellen vizsgálati rendszeren alapul, noha más protokollt alkalmaz (B.40 A. fejezet). Ez a módszer az emberi keratinsejteket tartalmazó rekonstruált emberi felhámmodelleken alapul, tehát a vizsgált faj célszervének *in vitro* vizsgálatáról van szó. Továbbá közvetlenül lefedi az irritáció során *in vivo* zajló gyulladásos kaszkád/hatásmechanizmus kezdeti lépését (körülírt sérülést eredményező sejt- és szövetkárosodás). E vizsgálati módszer hitelesítési eljárása során a vegyi anyagok széles körét vizsgálták, és a hitelesítési vizsgálat empirikus adatbázisa összesen 58 vegyi anyagra terjedt ki (16)(18)(23). Ezek között szilárd, folyékony és félszilárd anyagok, valamint viaszok is előfordulhatnak. A folyadékok lehetnek vizes vagy nem vizes alapúak, a szilárd anyagok pedig vízben oldódóak vagy vízben nem oldhatóak. Amennyiben lehetséges, a szilárd anyagokat alkalmazásuk előtt finom porrá kell törni, a minta egyéb előkezelése nem szükséges. Gázokat és aeroszolokat hitelesítési vizsgálat keretében még nem vizsgálták (24). Bár elképzelhető, hogy ezek is vizsgálhatók a rekonstruált emberi felhámmodellenes technikával, a jelenlegi vizsgálati módszer-leírás nem engedi meg gázok és aeroszolok vizsgálatát. Szintén megjegyzendő, hogy az erős színű vegyi anyagok befolyásolhatják a sejt életképességének méréseit, és a korrekció érdekében adaptált kontrollok alkalmazását teszik szükségessé (lásd a 24–26. bekezdéseket).
9. Ha a besorolás egyértelmű, akkor három szövetpéldány vizsgálatából álló egyszeri vizsgálatmenetnek elegendőnek kell lennie az adott vizsgált vegyi anyag esetében. Határértéken lévő eredmények esetében azonban, ha például az egyes szövetpéldányok eredményei nem egyeznek és/vagy az átlagos százalékos életképesség  $50 \pm 5\%$ , megfontolandó egy második vizsgálatmenet lefolytatása, és ha az első és a második vizsgálatmenet eredményei különböznek, akkor egy harmadiké is.

#### A VIZSGÁLAT ELVE

10. A vizsgált vegyi anyagot egy olyan nem transzformált emberi epidermális keratinsejteket tartalmazó, háromdimenziós emberi felhámmodellre viszik fel helyileg, amelyeket úgy tenyésztettek ki, hogy többretegű, erősen differenciált emberi felhámot (*epidermist*) alkossanak. Ez szervezett bazális, spinózus és granuláris sejtrétegekből, valamint intercelluláris lamelláris lipidrétegeket tartalmazó többretegű szarurétegből (*stratum corneum*) áll, amely az *in vivo* megtalálható lipidcsoportokhoz hasonló fő lipidcsoportokat tartalmazza.

11. Az irritatív hatású anyagok okozta, bőrpír és ödéma formájában megnyilvánuló bőrirritáció olyan eseménysorozat eredménye, amely az irritatív hatású anyagok *stratum corneum* történő penetrációjával és az alatta fekvő keratinsejtretegek roncsolódásával kezdődik. A pusztuló keratinsejtek mediátoranyagokat bocsátanak ki, amelyek a *dermisz* sejteire – főként a strómális és endoteliális sejtekre – ható gyulladáshoz vezető kaszkádot indítanak el. A megfigyelt bőrpírt és ödémát az endoteliális sejtek dilatációja és fokozott permeabilitása idézi elő (24). A rekonstruált emberi felhámmodellen alapuló módszerek a kaszkád kezdeti eseményeit mérik.
12. A rekonstruált emberi felhámmodellben a sejtek életképességét a MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék; CAS-szám: 298-93-1] vitális festék enzimatiszus úton kék formázán sóvá történő átalakulása alapján mérik, amelyet a szövetekből történő kivonás után mennyiségileg meghatároznak (25). Az irritatív hatású anyagokat azon képességük alapján azonosítják, hogy a sejtek életképességét meghatározott határérték alá (azaz az ENSZ GHS/EU CLP szerinti 2. kategóriájú anyagok esetében  $\leq 50\%$  alá) csökkentik. Azoktól a jogszabályi keretektől függően, amelyekben a vizsgálati módszer eredményeit fel fogják használni, a határérték feletti sejtleletképességet eredményező anyagok irritáló hatással nem rendelkezőnek tekinthetők (azaz  $50\%$  felett nincsenek kategóriába sorolva).

#### A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

13. Az e vizsgálati módszer alapján hitelesített három módszer bármelyikének rutinszerű alkalmazását megelőzően a laboratóriumoknak igazolniuk kell technikai jártasságukat az 1. táblázatban felsorolt tíz referenciaanyag felhasználásával. Az e vizsgálati módszer alapján kifejlesztett hasonló módszerek vagy a három hitelesített módszer bármelyikének módosításai esetén, a módszer hatósági vizsgálatokra történő használata előtt teljesíteni kell a vizsgálati módszer 2. függelékében ismertetett teljesítményszabvány előírásait.
14. A jártasság igazolásának részeként ajánlott, hogy a felhasználó a rekonstruált emberi felhámmodell gyártója által meghatározottak szerint, átvétel után ellenőrizze a szövetek barrierjellemzőit. Ez különösen fontos, ha a szöveteket nagy távolságra/hosszú ideig szállították. Ha egy módszert már sikeresen igazoltak, és az alkalmazásában való jártasságot bizonyították, akkor ilyen jellegű ellenőrzéseket nem szükséges rutinszerűen végezni. Ha azonban egy módszert rutinszerűen alkalmaznak, akkor a barrierjellemzőket javasolt továbbra is rendszeres időközönként ellenőrizni.

#### 1. táblázat

#### Referenciaanyagok <sup>(1)</sup>

Vegyvi anyag	CAS-szám	In vivo eredmény <sup>(2)</sup>	Halmazállapot	ENSZ GHS/EU CLP szerinti kategória
naftalin-ecetsav	86-87-3	0	szilárd	kategória nélküli
izopropanol	67-63-0	0,3	folyadék	kategória nélküli
metil-sztearát	112-61-8	1	szilárd	kategória nélküli
heptil-butirát	5870-93-9	1,7	folyadék	kategória nélküli (opcionális 3. kategória) <sup>(3)</sup> , <sup>(4)</sup>
hexil-szalicilát	6259-76-3	2	folyadék	kategória nélküli (opcionális 3. kategória) <sup>(3)</sup> , <sup>(4)</sup>
ciklámen-aldehid	103-95-7	2,3	folyadék	2. kat.
1-brómhexán	111-25-1	2,7	folyadék	2. kat.
kálium-hidroxid (5 %-os vizes oldat)	1310-58-3	3	folyadék	2. kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	3,3	szilárd	2. kat.
Heptanal	111-71-7	3,4	folyadék	2. kat.

<sup>(1)</sup> Ezek a referenciaanyagok a hitelesítési vizsgálat során alkalmazott referenciaanyagok alcsoportját képezik.

<sup>(2)</sup> In vivo eredmény a B.4. fejezet és az OECD 404. vizsgálati iránymutatása szerint <sup>(4)</sup>.

<sup>(3)</sup> E vizsgálati módszer alapján az ENSZ GHS szerinti opcionális 3. kategóriába tartozó anyagok (enyhe irritáló hatású anyagok) (1) »kategória nélküli« anyagoknak minősülnek.

<sup>(4)</sup> Az ENSZ GHS szerinti opcionális 3. kategória az EU CLP rendszerben nem alkalmazható.

## ELJÁRÁS

15. Az alábbiakban a rekonstruált emberi felhámmodellen végzett bőrritációs vizsgálat összetevőinek és eljárásainak leírása található. Rekonstruált emberi felhámmodellt kell felépíteni; a modell elkészíthető házon belül vagy beszerzhető kereskedelmi forgalomból. Az EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) és SkinEthic™ RHE módszerekhez szabványműveleti előírások (SOP) állnak rendelkezésre (26)(27)(28). A vizsgálatot az alábbiak szerint kell végrehajtani:

**A rekonstruált emberi felhámmodellel végzett módszer összetevői***Általános feltételek*

16. Az epitélium felépítéséhez nem transzformált emberi keratinsejteket kell használni. Élő epitelsejtek több rétegének (bazális réteg, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) kell jelen lennie a funkcionális *stratum corneum* alatt. A *stratum corneum*nak többretegűnek kell lennie, és tartalmaznia kell az elengedhetetlenül szükséges lipidprofilot, hogy nagy ellenálló képességgel rendelkező funkcionális barriert képezzen a citotoxikus markeranyagok, pl. a nátrium-dodecilszulfát (SDS) vagy a Triton X-100 gyors áthatolása ellen. A barrierfunkciót bizonyítani kell, ennek értékelése vagy a markeranyag azon koncentrációjának meghatározásával történik, amely a szövetek életképességét meghatározott expozíciós idő elteltével 50 %-kal csökkenti (IC<sub>50</sub>), vagy a markeranyag meghatározott, állandó koncentrációban történő alkalmazásakor a sejtek életképességének 50 %-kal való csökkentéséhez szükséges expozíciós idő (ET<sub>50</sub>) meghatározásával. A rekonstruált emberi felhámmodell folyadékzáró tulajdonságainak meg kell akadályozni, hogy az anyag áthatoljon a *stratum corneum* körül az élő szövetbe, amely a bőr expozíciójának rossz modellezését eredményezné. A rekonstruált emberi felhámmodellnek baktérium-, vírus-, mikoplazma- és gombafertőzéstől mentesnek kell lennie.

*Funkcionális feltételek**Életképesség*

17. Az életképesség nagyságrendjének meghatározásához az MTT-vizsgálatot alkalmazzák (25). A rekonstruált emberi felhámmodell (RhE) felhasználóinak biztosítaniuk kell, hogy az alkalmazott RhE minden egyes tétele megfeleljen a negatív kontrollra (NC) vonatkozóan meghatározott kritériumoknak. Az extraháló oldószere optikai sűrűségének (OD) eléggé alacsonynak, azaz 0,1 alattinak kell lennie. A RhE modell gyártója/forgalmazója (a bőrritációs meghatározására irányuló vizsgálati módszer feltételeiben) a negatív kontroll OD-értékeire vonatkozóan elfogadási tartományt (felső és alsó határérték) ad meg; a három hitelesített módszerre vonatkozó elfogadási tartományok a 2. táblázatban vannak feltüntetve. Dokumentálni kell, hogy a negatív kontrollal kezelt szövetek stabil tenyészetben vannak (hasonló életképességi értékeket adnak) a vizsgálat során alkalmazott expozíció időtartama alatt.

## 2. táblázat

**A negatív kontrollok OD-értékeinek elfogadási tartományai**

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

*Barrierfunkció*

18. A *stratum corneum*nak és lipidprofiljának az IC<sub>50</sub> vagy ET<sub>50</sub> alapján végzett becslések szerint (3. táblázat) megfelelő ellenálló képességgel kell rendelkeznie a citotoxikus markeranyagok, például a nátrium-dodecilszulfát (SDS) vagy a Triton X-100 gyors áthatolásának megakadályozására.

*Morfológia*

19. A rekonstruált emberi felhámmodellen szövettani vizsgálatot kell végezni, amely igazolja a humán *epidermisz* szerű szerkezetet (beleértve a többretegű *stratum corneum*ot is).

*Reprodukálhatóság*

20. A módszer során vizsgált pozitív kontrollanyagok (PC) és negatív kontrollanyagok (NC) eredményeinek a későbbiekben reprodukálhatónak kell lenniük.

## Minőség-ellenőrzés (QC)

21. A rekonstruált emberi felhámmodell előállítójának/forgalmazójának gondoskodnia kell arról, és igazolnia kell azt, hogy az alkalmazott RhE modell minden egyes tétele megfelel a gyártás utáni felszabadításra vonatkozóan meghatározott feltételeknek, amelyek közül az *életképességre* (17. bekezdés), a *barrierfunkcióra* (18. bekezdés) és a *morfológiára* (19. bekezdés) vonatkozó kritériumok a leglényegesebbek. Ezeket az adatokat a módszer felhasználóinak rendelkezésére kell bocsátani, hogy ezeket az információkat fel tudják tüntetni a vizsgálati jelentésben. Az RhE-modell kifejlesztőjének/forgalmazójának (illetve házon belüli modell használata esetén a vizsgálatot végző személynek) az IC<sub>50</sub> és az ET<sub>50</sub>-értékekre vonatkozóan elfogadási tartományt (felső és alsó határértéket) kell megállapítania. Az irritáló hatás besorolásának megbízható előrejelzéseként kizárólag minősített szöveteken végzett vizsgálatok eredményei fogadhatók el. A 3. táblázatban például a három hitelesített módszerhez alkalmazott elfogadási tartományok láthatók.

## 3. táblázat

## Példák a minőség-ellenőrzésre szolgáló tételeknél alkalmazott felszabadítási kritériumokra

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiSkin™ (SM) (18 órás kezelés nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) (26))	IC <sub>50</sub> = 1,0 mg/ml	IC <sub>50</sub> = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100)(27)	ET <sub>50</sub> = 4,8 óra	ET <sub>50</sub> = 8,7 óra
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100)(28)	ET <sub>50</sub> = 4,0 óra	ET <sub>50</sub> = 9,0 óra

## A vizsgált anyagok és kontrollanyagok alkalmazása

22. Minden vizsgálatmenetben valamennyi vizsgált vegyi anyaghoz és kontrollhoz legalább három szövetpéldányt kell használni. Folyékony és szilárd anyagok esetében egyaránt megfelelő mennyiségű vizsgált vegyi anyagot kell alkalmazni, hogy az egyenletesen fedje az *epidermisz* felszínét, azaz minimum 25 µl/cm<sup>2</sup> vagy 25 mg/cm<sup>2</sup>-ot, ugyanakkor el kell kerülni végtelen dózis alkalmazását. Szilárd anyagok alkalmazása előtt az *epidermisz* felületét ionmentesített vagy desztillált vízzel be kell nedvesíteni, hogy jobb legyen az érintkezés a vizsgált vegyi anyag és az *epidermisz* felszíne között. Amennyiben lehetséges, a szilárd anyagokat finom por formájában kell vizsgálni. Az expozíciós idő lejárásával a vizsgált vegyi anyagot vizes alapú pufferral vagy 0,9 %-os NaCl-dal óvatosan le kell mosni az *epidermisz* felületéről. Attól függően, hogy a három hitelesített RhE-módszer közül melyiket alkalmazzák, az expozíciós idő 15–60 perc között, az inkubációs hőmérséklet pedig 20–37 °C között változhat. Ezeket az expozíciós időket és hőmérsékleteket a módszerek természetéből adódó jellemzők figyelembevételével mindegyik RhE-módszere optimalizálták; ennek részleteit lásd a módszerek szabványműveleti előírásaiban (SOP) (26)(27)(28).
23. Minden vizsgálatmenet során párhuzamos negatív (NC) és pozitív (PC) kontrollt is alkalmazni kell annak bizonyítására, hogy a szövetek (negatív kontrollal bizonyított) életképessége, barrierfunkciója és a (pozitív kontrollal bizonyított) kapott szövetérzékenység a korábbi adatok alapján meghatározott elfogadási tartományon belül van. A javasolt pozitív kontrollanyag nátrium-dodecil-szulfát (SDS) 5 %-os vizes oldata. A javasolt negatív kontrollanyag a víz vagy a foszfátpuffert tartalmazó sóoldat (PBS).

## A sejtek életképességének mérése

24. A vizsgálati eljárás legfontosabb eleme, hogy az életképesség mérését ne közvetlenül a vizsgált vegyi anyaggal végzett expozíció után végezzük, hanem friss tápközeggel történt átöblítés után, megfelelő hosszúságú kezelés utáni inkubációs időszakot követően. Ez az időszak egyaránt lehetővé teszi az enyhe irritatív hatás utáni felépülést, valamint az egyértelmű citotoxikus hatások megjelenését. A vizsgálat optimalizálási szakasza (11) (12) (13) (14) (15) azt mutatta, hogy 42 órás kezelés utáni inkubációs időszak az optimális.
25. Az MTT vizsgálat egy olyan kvantitatív hitelesített módszer, amelyet e vizsgálati módszer során a sejtek életképességének méréséhez kell alkalmazni. A vizsgálat kompatibilis a háromdimenziós szövetkonstrukcióban történő használattal. A szövetmintát 3 órára megfelelő koncentrációjú (például 0,3–1 mg/ml) MTT-oldatba kell helyezni. A kicsapódott kék formazán terméket ezután oldószer (például izopropanol, savas izopropanol) használatával ki kell vonni a szövetből, és a formazán koncentrációját az OD 570 nm-en történő mérésével, egy maximum ± 30 nm sávszűrő alkalmazásával meg kell határozni.
26. A vizsgált vegyi anyag optikai tulajdonságai vagy az MTT-re gyakorolt kémiai hatása megzavarhatja a vizsgálatot, ami az életképesség téves megállapításához vezet (mivel a vizsgált anyag akadályozhatja, visszafordíthatja vagy akár elő is idézheti az elszíneződést). Ez akkor következhet be, amikor egy adott vizsgált vegyi anyagot öblítéssel nem távolítottak el teljesen a szövetből, vagy amikor az anyag áthatol az *epidermisz*en. Ha a vizsgált vegyi anyag közvetlen hatást gyakorol az MTT-re (MTT-redukáló), természetes állapotában is színes, vagy a szövetkezelés során elszíneződik, akkor további kontrollokat kell alkalmazni annak kimutatására és korrigálására, hogy a vizsgált vegyi anyag befolyásolja az életképesség mérésének módját. A három hitelesített módszer szabványműveleti előírásaiban megtalálható annak részletes leírása, hogyan kell korrigálni a közvetlen MTT-redukáló hatást és a színezőanyagok okozta zavaró hatást (26)(27)(28).

### Elfogadhatósági kritériumok

27. Minden olyan módszer esetében, melynek során érvényes RhE-modell tételeket alkalmaznak (lásd a 21. bekezdést), a negatív kontrollal kezelt szöveteknek olyan OD-t kell mutatniuk, amely tükrözi a szöveteknek a szállítást és az átvételi lépéseket, valamint az összes protokollfolyamatot követő minőségét. A kontrollok OD-értékei nem lehetnek alacsonyabbak a korábbi adatok alapján megállapított határértékeknél. Hasonlóképpen a pozitív kontrollal, vagyis nátrium-dodecil-szulfát (SDS) 5 %-os vizes oldatával kezelt szöveteknek tükrözniük kell, hogy azok a vizsgálati módszer körülményei között képesek válaszreakciót adni az irritáló hatású anyagokra (26) (27) (28). A szövetpéldányok közötti variabilitás kapcsolódó, megfelelő mutatóit meg kell határozni (ha például a szórást (SD) alkalmazzák, ennek a régebbi adatok alapján számolt egyoldalú 95 %-os toleranciaintervallumon belül kell lennie; a hitelesített referencia-módszer esetében a szórásnak 18 % alatt kell lennie).

### Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

28. Az egyes vizsgált vegyi anyagokra vonatkozóan kapott OD-értékek felhasználhatók a negatív kontrollra normalizált életképesség százalékos arányának kiszámításához, amely 100 %-ra van beállítva. Az irritáló anyagokat a kategória nélküli vizsgált vegyi anyagoktól megkülönböztető százalékos sejtelétképesség határértékét, valamint az eredmények értékeléséhez és az irritáló hatású vegyi anyagok meghatározásához alkalmazott statisztikai eljárás(oka)t egyértelműen meg kell határozni, dokumentálni kell, és megfelelésüket igazolni kell. Az irritáló hatás előrejelzésére alkalmazott határértékek az alábbiak:

- A vizsgált vegyi anyag az ENSZ GHS/EU CLP 2. kategóriájába tartozó bőrirritáló hatású anyagnak tekintendő, amennyiben az expozíció és a kezelést követő inkubáció után a szövet életképessége ( $\leq$ ) 50 % vagy ennél kevesebb.
- Azoktól a jogszabályi keretektől függően, amelyekben a vizsgálati módszer eredményeit fel fogják használni, a vizsgált vegyi anyag az ENSZ GHS/EU CLP szerint kategóriába nem sorolt, bőrirritáló hatással nem rendelkező anyagnak tekintendő, amennyiben az expozíció és a kezelést követő inkubáció után a szövet életképessége ( $>$ ) 50 %-nál nagyobb.

### ADATOK ÉS JELENTÉS

#### Adatok

29. Mindegyik vizsgálatmenetre vonatkozóan táblázatos jelentést kell készíteni az egyes szövetpéldányok adatairól (például OD-értékek és számított százalékos sejt-életképességi adatok az egyes vizsgált vegyi anyagok esetében, a besorolást is beleértve), amelyben szerepelnie kell a megismételt kísérletek adatainak is, ha voltak ilyenek. Továbbá mindegyik vizsgálatmenet esetében meg kell adni az átlagot  $\pm$  szórást. Az MTT reagenssel és a színes vizsgált vegyi anyagokkal megfigyelt kölcsönhatásokat a jelentésben minden vizsgált vegyi anyag esetében fel kell tüntetni.

#### Vizsgálati jelentés

30. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

##### Vizsgált anyagok és kontrollanyagok:

- a vegyi anyag(ok) neve, például a CAS-név és -szám, EU-név és -szám, ha ismert,
- a vegyi anyag tisztasága és összetétele (tömegszázalékban),
- a vizsgálat elvégzése szempontjából lényeges fizikai/kémiai tulajdonságok (pl. halmazállapot, stabilitás, illékonyság, pH és vízdékonyság, ha ismert),
- a vizsgált vegyi anyagok/kontrollanyagok vizsgálatot megelőző kezelése, ha történt ilyen (például melegítés, porítás),
- tárolási feltételek.

##### Az alkalmazott rekonstruált emberi felhámmodell és protokoll indoklása

##### Vizsgálati körülmények:

- a felhasznált sejtrendszer,
- az alkalmazott specifikus RhE-modellre vonatkozó teljes körű alátámasztó adatok, köztük a modell teljesítménye. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:
  - i. életképesség;
  - ii. barrierfunkció;
  - iii. morfológia;
  - iv. reprodukálhatóság és prediktív érték;
  - v. a modell minőség-ellenőrzése (QC),
- az alkalmazott vizsgálati eljárás részletei,
- az alkalmazott vizsgálati dózisok, az expozíció időtartama és a kezelés utáni inkubációs időszak hossza,
- a vizsgálati eljáráson végzett bármilyen változtatás leírása,

- hivatkozás a modellel kapott korábbi adatokra. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:
  - i. a minőség-ellenőrzési adatok elfogadhatósága tekintettel a tételre vonatkozó korábbi adatokra;
  - ii. a pozitív és negatív kontrollértékek elfogadhatósága tekintettel a pozitív és negatív kontrollok átlagértékeire és tartományaira;
- az alkalmazott értékelési kritériumok leírása, beleértve az előrejelző modellhez választott határérték(ek) indoklását,
- hivatkozás a régebbi kontrolladatokra,

#### Eredmények:

- az egyes vizsgált vegyi anyagok adatainak táblázatos bemutatása mindegyik vizsgálatmenet és mindegyik szövetpéldány esetében,
- a közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező és/vagy színváltozást okozó vegyi anyagokhoz alkalmazott kontrollok feltüntetése,
- a megfigyelt egyéb jelenségek leírása.

Az eredmények tárgyalása

Következtetés

#### SZAKIRODALOM

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Elektronikus formátumban: [[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev03/03files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html)]
- (2) EC-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" ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 2009. április 9. Elektronikus formátumban: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (3) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353., 2008.12.31., 1. o.
- (4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (5) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (6) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (7) OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RHE)? Elektronikus formátumban: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (9) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (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 Rubinsteen, 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., mailto: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., mailto: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- $\alpha$ . Elektronikus formátumban: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (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, AATEX, 14, 351-358.
- (20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Elektronikus formátumban: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Elektronikus formátumban: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (22) EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Elektronikus formátumban: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (23) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [[http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en\\_2649\\_34377\\_47858904\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html)]
- (24) 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.
- (25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55-63.
- (26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min – 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Elektronikus formátumban: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Elektronikus formátumban: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Elektronikus formátumban: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- (30) A Bizottság 2001/59/EK irányelve (2001. augusztus 6.) a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló 67/548/EGK tanácsi irányelvnek a műszaki fejlődéshez történő huszonnyolcadik hozzáigazításáról, HL L 225., 2001.8.21., 1. o.
- (31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1-4.

- (32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, ALTEX, 14, 359-365.
- (33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109-116.

### 1. függelék

#### Fogalom meghatározások

**Pontosság:** A vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az »egyezés« megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (9).

**Sejtek életképessége:** A sejtpopulációk teljes aktivitását mérő paraméter (például a celluláris mitokondriális dehidrogenázoknak az MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék] vitális festéket redukáló képessége), amely – a mért végponttól és az alkalmazott vizsgálati tervtől függően – korrelációt mutat az élő sejtek teljes számával és/vagy életképességével.

**Egyezés:** A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. A kifejezést a pontosság szinonimájaként használják, és a vizsgált vegyi anyagok közül az adott módszerrel helyesen a pozitív vagy negatív eredményt adók közé besorolható vegyi anyagok arányát fejezi ki (9).

**ET<sub>50</sub>:** A marker vegyi anyag meghatározott, állandó koncentrációban történő alkalmazása esetén a sejt életképességének 50 %-kal való csökkentéséhez szükséges expozíciós idő meghatározásával becsülhető meg, lásd még az IC<sub>50</sub>-et.

**EU CLP (Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról):** Az ENSZ által kidolgozott, vegyi anyagok (anyagok és keverékek) osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerét (GHS) az Európai Unióban (EU) végrehajtó rendelet (3).

**GHS (az ENSZ által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere):** Anyagoknak és keverékeknek a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkaadók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse az anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

**IC<sub>50</sub>:** Annak a koncentrációnak a meghatározásával becsülhető meg, amelynél egy adott markeranyag egy meghatározott expozíciós idő elteltével 50 %-kal (IC<sub>50</sub>) csökkenti a szövetek életképességét; lásd még az ET<sub>50</sub>-et.

**Végtelen dózis:** Az *epidermiszen* alkalmazott vizsgált vegyi anyag azon mennyisége, amely meghaladja az *epidermisz* felszínének teljes és egyenletes befedéséhez szükséges mennyiséget.

**Me-too vizsgálat:** Olyan vizsgálati módszerek köznapi elnevezése, amelyek strukturálisan és funkcionálisan hasonlóak egy hitelesített és elfogadott referenciaként szolgáló vizsgálati módszerhez. Az ilyen vizsgálati módszerek esetében megfelelő lehet az úgynevezett »catch-up« (rövidített) hitelesítési eljárás. A hasonló vizsgálati módszer szinonimája (9).

**Teljesítményszabványok:** Hitelesített referencia-módszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionális szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a hitelesített vizsgálati módszer elfogadható teljesítményének igazolására alkalmazott vegyi anyagok közül kiválasztott referenciaanyagok minimális listája; valamint iii. a hitelesített vizsgálati módszerrel kapott eredmények alapján az az összehasonlítható szintű pontosság és megbízhatóság, amelyet a javasolt vizsgálati módszernek a referenciaanyagok minimális listájával történő értékeléskor mutatnia kell (9).

**Referenciaanyagok:** A hitelesítési eljárás során történő alkalmazásra kiválasztott olyan vegyi anyagok, amelyek esetében már ismert az *in vitro* vagy *in vivo* referencia-vizsgálatrendszerben vagy vizsgált fajnál adott válaszreakció. Ezeknek a vegyi anyagoknak reprezentatívnak kell lenniük arra az anyagcsoportra nézve, amely esetében a vizsgálati módszert várhatóan alkalmazni fogják, és képviselniük kell azon vegyi anyagokra jellemző válaszreakciók teljes tartományát – az erőstől kezdve a gyengén át a negatívig –, amelyek esetében az adott referenciaanyag alkalmazható. A hitelesítési eljárás különböző szakaszaiban, illetve a különböző vizsgálati módszerekhez és vizsgálati alkalmazásokhoz a referenciaanyagok különböző csoportjaira lehet szükség (9).

**Relevancia:** A vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) kell figyelembe venni (9).

**Megbízhatóság:** Azonos protokoll szerint végzett vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóságának mérésére szolgál. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (9).

**Helyettesítő vizsgálat:** Olyan vizsgálat, amelynek célja, hogy a veszélyek azonosítására és/vagy kockázatértékelésre rutinszerűen alkalmazott és elfogadott vizsgálatot helyettesítse, és amelyről megállapították, hogy az elfogadott vizsgálatral összehasonlítva, az összes lehetséges vizsgálati helyzetben és vegyi anyag esetében a humán vagy állati egészség egyenértékű vagy jobb védelmét biztosítja (9).

**Érzékenység:** A vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes pozitív/aktív vizsgált vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

**Bőrirritáció:** A vizsgált vegyi anyag alkalmazását követően 4 órán belül megjelenő, visszafordítható bőrkárosodás. A bőrirritáció helyileg jelentkező, nem immunogén reakció, amely röviddel a stimuláció után megjelenik (29). Fő jellemzője, hogy gyulladáshoz vezető reakciókkal és gyulladáshoz vezető folyamat által okozott irritáció klinikailag jellemző jeleinek többségével (bőrpír, ödéma, viszketés és fájdalom) kísért, visszafordítható folyamat.

**Specifitás:** A vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vizsgált vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

**Többosztályú vizsgálati stratégia:** Egymás után következő vizsgálati módszereket alkalmazó vizsgálat; az egyes egymást követő szinteken választandó vizsgálati módszerekről a vizsgálat előző szintjén kapott eredmények alapján kell dönteni (9).

**Vizsgált vegyi anyag (más néven vizsgált anyag):** Bármely anyag vagy keverék, amelyet ezzel a vizsgálati módszerrel vizsgálnak.

## 2. függelék

### Teljesítményszabványok a javasolt hasonló vagy módosított, *IN VITRO* rekonstruált emberi felhámmodellen végzett bőrirritációs vizsgálatok értékeléséhez

#### BEVEZETÉS

1. A teljesítményszabványok (PS) célja annak ismertetése, hogy milyen alapon lehet egy új vizsgálati módszerről – akár védett (például szerzői joggal védett, védjeggyel ellátott, bejegyzett), akár nem védett módszerről – megállapítani, hogy adott vizsgálati célokra kellő pontossággal és megbízhatósággal rendelkezik. Ezek a hitelesített és elfogadott vizsgálati módszereken alapuló teljesítményszabványok a hasonló tudományos elvekre és mérésre épülő, illetve azonos biológiai vagy toxikus hatást előrevetítő módszerek (köznap elnevezéssel »mee-too« vizsgálatok) megbízhatóságának és pontosságának értékelésére alkalmazhatók (9).
2. A módosított módszerek (például tervezett esetleges javítás egy jóváhagyott módszeren) alkalmazása előtt értékelést kell végezni annak meghatározására, hogy a tervezett változtatások milyen hatást gyakorolnak a vizsgálat teljesítményére, és milyen mértékben befolyásolják a hitelesítési folyamat egyéb összetevőiről rendelkezésre álló információkat. A tervezett változtatások számától és jellegétől, valamint a változtatásokra vonatkozóan keletkezett adatoktól és alátámasztó dokumentációtól függően ezeket vagy az új vizsgálatokra előírtakkal megegyező hitelesítési eljárásnak, vagy – amennyiben ez lehetséges – a megállapított teljesítményszabványban foglalt korlátozott megbízhatósági és relevanciaértékelésnek kell alávetni (9).
3. A három hitelesített módszer (EpiSkin™ [hitelesített referencia-módszer – VRM], EpiDerm™ SIT [EPI-200] és SkinEthic™ RHE) bármelyikének hasonló (»mee-too«) vagy módosított, e vizsgálati módszerben alkalmazásra javasolt változatát a megbízhatóság és pontosság meghatározása érdekében a Draize-féle irritációs pontértékek teljes tartományát képviselő anyagok felhasználásával kell értékelni. A teljesítményszabvány húsz javasolt referenciaanyagának (1. táblázat) felhasználásával történő értékelés során a javasolt hasonló vagy módosított eljárás által elért megbízhatósági és pontossági értékeknek hasonlónak kell vagy jobbnak kell lenniük a hitelesített referencia-módszer (VRM) ugyanezen értékeinél (2. táblázat) (2) (16). Az elérendő pontossági és megbízhatósági értékek a függelék 8–12. bekezdésében találhatók. A függelékben különféle kémiai osztályokat képviselő besorolás nélküli (az ENSZ GHS/EU CLP szerint kategória nélküli) és besorolással rendelkező (az ENSZ GHS/EU CLP szerinti 2. kategóriába tartozó) (1) kémiai anyagokat tüntettek fel, hogy a javasolt vizsgálati módszer és a hitelesített referencia-módszer megbízhatóságát és pontosságát (érzékenység, specifitás és összesített pontosság) össze lehessen hasonlítani. Új vegyi anyagok vizsgálatára történő alkalmazását megelőzően a vizsgálati módszer megbízhatóságát, valamint az ENSZ GHS/EU CLP szerinti 2. kategóriába tartozó irritatív hatású anyagok, illetve – az adatszolgáltatást igénylő szabályozási keretből függően – az ENSZ GHS/EU CLP szerinti kategória nélküli anyagok helyes azonosítására való képességét is bizonyítani kell.

4. Ezek a teljesítményszabványok az EC-ECVAM teljesítményszabványon alapulnak (8), és ezeket az osztályozásra és címkézésre vonatkozó ENSZ GHS és EU CLP rendszer szerint aktualizálták (1) (3). Az eredeti teljesítményszabványt a hitelesítési vizsgálat (21) elvégzése után határozták meg, a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló 67/548/EGK tanácsi irányelvnek a műszaki fejlődéshez történő huszonnyolcadik hozzáigazításáról szóló, 2001. augusztus 6-i 2001/59/EK bizottsági irányelvben <sup>(1)</sup> rögzített uniós osztályozási rendszer alapján. Mivel a hitelesítési vizsgálat befejezése és az e vizsgálati módszer elkészítése közötti időszakban az EU átvette (EU CLP) az ENSZ osztályozásra és címkézésre vonatkozó GHS rendszerét (3), a teljesítményszabványt aktualizálták (8). Ez az aktualizálás főként i. a teljesítményszabványban foglalt referenciaanyagok körét, valamint ii.a meghatározott megbízhatósági és pontossági értékeket érintő változásokat jelent (2) (23).

#### REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMMODELLEN VÉGZETT IN VITRO BŐRIRRITÁCIÓS VIZSGÁLATOK TELJESÍTMÉNYSZABVÁNYA

5. A teljesítményszabvány a következő három elemet foglalja magában (9):

- I. A vizsgálati módszer alapvető összetevői
- II. A referenciaanyagok minimális listája
- III. A megbízhatóság és a pontosság meghatározott értékei

##### I. A vizsgálati módszer alapvető összetevői

6. Ezek egy adott hitelesített módszer azon elengedhetetlen szerkezeti, funkcionális és procedurális elemeit jelentik, amelyeket a javasolt, technikailag és funkcionálisan hasonló vagy módosított módszer protokolljának tartalmaznia kell. Ezen összetevők közé tartoznak a módszer egyedi jellemzői, döntő fontosságú procedurális részletei, valamint a minőség-ellenőrzési lépések. A vizsgálati módszer alapvető elemeinek betartása elősegíti annak biztosítását, hogy a javasolt hasonló vagy módosított módszer ugyanazokon az elveken alapuljon, mint a vonatkozó hitelesített referencia-módszer (9). A vizsgálati módszer alapvető összetevőinek részletes ismertetése a vizsgálati módszer leírásának 16–21. bekezdésében található, és a vizsgálatot a következők szerint kell végezni:

- Általános feltételek (16. bekezdés)
- Funkcionális feltételek, többek között:
  - életképesség (17. bekezdés),
  - barrierfunkció (18. bekezdés),
  - morfológia (19. bekezdés),
  - reprodukálhatóság (20. bekezdés), valamint
  - minőség-ellenőrzés (21. bekezdés).

##### II. A referenciaanyagok minimális listája

7. Referenciaanyagokat kell alkalmazni annak megállapítására, hogy a hitelesített referencia-módszerekhez szerkezeti és funkcionálisan igazoltan hasonló, vagy a három hitelesített módszer egyikének kisebb módosítását képviselő javasolt módszer megbízhatósága és pontossága hasonló vagy jobb eredményeket mutat, mint a hitelesített referencia-módszeré (2) (8) (16) (23). Az 1. táblázatban felsorolt 20 ajánlott referenciaanyag között különböző kémiai osztályokat képviselő anyagok (vagyis a funkcionális csoportok alapján meghatározott kémiai osztályok) találhatóak, amelyek a Draize-féle irritációs pontértékek teljes tartományát lefedik (a nem irritálótól az erősen irritálóig). A listán szereplő vegyi anyagok közül 10 tartozik az ENSZ GHS/EU CLP szerinti 2. kategóriába, 10 anyag pedig nincs kategóriába sorolva, amelyek közül 3 az ENSZ GHS szerinti opcionális 3. kategóriába tartozik. E vizsgálati módszer szerint az opcionális 3. kategóriába tartozó anyagok »kategória nélkülinek« minősülnek. Az 1. táblázatban felsorolt vegyi anyagokat a hitelesített referencia-módszer előhitelesítést követő optimalizációs fázisában és hitelesítési vizsgálata során alkalmazott anyagok közül választották ki, figyelembe véve a kémiai funkciót és a halmazállapotot (14) (18). Ezek a referenciaanyagok képezik azon anyagok minimális számát, amelyeket egy javasolt hasonló vagy módosított módszer pontosságának és megbízhatóságának értékeléséhez fel kell használni, új módszerek kifejlesztéséhez azonban nem szabad alkalmazni. Olyan esetekben, amikor a listában szereplő anyagok egyike nem hozzáférhető, alkalmazható más olyan anyag, amelyre vonatkozóan megfelelő *in vivo* referenciaadatok állnak rendelkezésre, és amelyet elsősorban a hitelesített referencia-módszer előhitelesítését követő optimalizációs szakaszban vagy a hitelesítési vizsgálat során alkalmazott anyagok közül kell kiválasztani. Szükség esetén a javasolt vizsgálati módszer pontosságának további értékeléséhez a referenciaanyagok minimális listája kiegészíthető más kémiai osztályba tartozó és megfelelő *in vivo* referenciaadatokkal rendelkező további anyagokkal.

<sup>(1)</sup> HL L 225., 2001.8.21., 1. o.

1. táblázat

A hasonló vagy módosított, rekonstruált emberi felhám (epidermisz) végzett bőrirritációs vizsgálati módszerek pontossági és megbízhatósági értékeinek meghatározásához alkalmazandó referenciaanyagok minimális listája <sup>(1)</sup>

Vegyí anyag	CAS-szám	Halmazállapot	In vivo eredmény	VRM in vitro kategória	ENSZ GHS/EU CLP in vivo kategória
1-bróm-4-klórbután	6940-78-9	folyadék	0	2. kat.	kategória nélküli
dietilftalát	84-66-2	folyadék	0	kategória nélküli	kategória nélküli
naftalin-ecetsav	86-87-3	szilárd	0	kategória nélküli	kategória nélküli
allil-fenoxi-acetát	7493-74-5	folyadék	0,3	kategória nélküli	kategória nélküli
izopropanol	67-63-0	folyadék	0,3	kategória nélküli	kategória nélküli
4-metil-tio-benzaldehid	3446-89-7	folyadék	1	2. kat.	kategória nélküli
metil-sztearát	112-61-8	szilárd	1	kategória nélküli	kategória nélküli
heptil-butirát	5870-93-9	folyadék	1,7	kategória nélküli	kategória nélküli
hexil-szalicilát	6259-76-3	folyadék	2	kategória nélküli	kategória nélküli
Cinnamaldehyd	104-55-2	folyadék	2	2. kat. 2	kategória nélküli (opcionális 3. kategória) <sup>(3)</sup>
1-dekanol <sup>(2)</sup>	112-30-1	folyadék	2,3	2. kat.	2. kat.
ciklámén-aldehyd	103-95-7	folyadék	2,3	2. kat.	2. kat.
1-brómhexán	111-25-1	folyadék	2,7	2. kat.	2. kat.
2-klórmetil-3,5-dimetil-4-metoxipiridin-hidroklorid	86604-75-3	szilárd	2,7	2. kat. 2	2. kat.2
di-n-propil-diszulfid <sup>(2)</sup>	629-19-6	folyadék	3	kategória nélküli	2. kat.
kálium-hidroxid (5 %-os vizes oldat)	1310-58-3	folyadék	3	2. kat.	2. kat.
benzotiol, 5-(1,1-dimetil-etil)-2-metil	7340-90-1	folyadék	3,3	2. kat.	2. kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	szilárd	3,3	2. kat.	2. kat.
Heptanal	111-71-7	folyadék	3,4	2. kat.	2. kat.
Tetraklóretilén	127-18-4	folyadék	4	2. kat.	2. kat.

<sup>(1)</sup> A vegyi anyagok kiválasztása a következő kritériumokon alapul: i. az anyag kereskedelmi forgalomban kapható; ii. képviseli a Draize-féle bőrirritációs pontértékek teljes tartományát (a nem irritálótól az erősen irritálóig); iii. jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkezik; iv. reprezentatív a hitelesítési folyamat során alkalmazott kémiai funkcionalitás tekintetében; és v. nem rendelkezik rendkívül toxikus profillal (például karcinogén hatással vagy reprodukzív toxicitással), valamint ártalmatlanítása nem jár problémát jelentő költségekkel.

<sup>(2)</sup> Nyulaknál irritáló hatású vegyi anyagoknak számítanak, emberekre azonban megbízható bizonyítékok alapján nincs irritáló hatásuk <sup>(31)</sup> <sup>(32)</sup> <sup>(33)</sup>.

<sup>(3)</sup> Az ENSZ GHS szerint, az EU CLP szabványban nem szerepel.

### III. A megbízhatóság és a pontosság meghatározott értékei

8. A laboratóriumok között átadni kívánt javasolt hasonló vagy módosított módszerek megbízhatóságának és relevanciájának megállapításához az 1. táblázatban szereplő mind a 20 referenciaanyagot legalább három laboratóriumban kell vizsgálni. Ha azonban a javasolt módszert csak egy laboratóriumban kívánják alkalmazni, akkor a hitelesítéshez nem szükséges a több laboratóriumban végzett tesztelés. Elengedhetetlenül fontos azonban, hogy ezeket a hitelesítési vizsgálatokat nemzetközileg elismert, hitelesítéssel foglalkozó testületek a nemzetközi irányelvekkel összhangban függetlenül értékeljék (9). Mindegyik laboratóriumban 20 referenciaanyagot kell vizsgálni különböző szövettételekkel végzett három független menetben, megfelelő időt hagyva az egyes menetek között. Mindegyik menetek legalább három, párhuzamos szövetmintapéldány vizsgálatát kell magában foglalnia a listában szereplő egyes vegyi anyagok, negatív kontroll és pozitív kontroll alkalmazásával.
9. A javasolt módszer megbízhatósági és pontossági értékeinek kiszámítását az alábbi négy kritérium együttes figyelembevételével kell végezni, biztosítva, hogy a megbízhatóságot és a relevanciát jellemző értékek előre meghatározott és következetes módon kerüljenek kiszámításra:
  1. Csak olyan vizsgálatmenetek adatai vonhatók be a módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti variabilitásának és prediktív értékének (pontosságának) kiszámításába, amelyek esetében a teljes vizsgálatsor lezajlott.
  2. Az egyes referenciaanyagok végleges besorolását mindegyik laboratóriumban egy teljes vizsgálatsor különböző vizsgálataiban megfigyelt életképesség átlagértékének felhasználásával kell meghatározni.
  3. A laboratóriumok közötti variabilitás kiszámítása során csak azokra a vegyi anyagokra vonatkozó adatokat szabad figyelembe venni, amelyek esetében minden résztvevő laboratóriumban végrehajtották a teljes vizsgálatsort.
  4. A pontossági értékek kiszámítását a 20 referenciaanyagra vonatkozóan a különböző résztvevő laboratóriumokban kapott egyes laboratóriumi besorolások alapján kell végezni.

Ebben a szövegösszefüggésben a **vizsgálatsor** adott vizsgált vegyi anyaggal egy laboratórium által elvégzett három független vizsgálatmenetet jelent. A **teljes vizsgálatsor** egy adott vizsgált vegyi anyaggal egyetlen laboratórium által végzett olyan vizsgálatsort jelent, amelyben mindhárom vizsgálat érvényes. Ez azt jelenti, hogy egyetlen érvénytelen vizsgálatmenet érvénytelenné teszi a három vizsgálatmenetből álló sorozat egészét.

#### Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság

10. A laboratóriumon belüli reprodukálhatóság vizsgálata során a húsz referenciaanyag egyetlen laboratóriumban történő, egymástól független, különböző vizsgálatmenetei során kapott besorolási eredményeknek (ENSZ GHS/EU CLP szerinti 2. kategória vagy kategória nélküli) legalább ( $\geq$ ) 90 %-os egyezést kell mutatniuk.

#### Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság

11. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság vizsgálata nem feltétlenül szükséges, amennyiben a javasolt vizsgálati módszer csak egy laboratóriumban kerül alkalmazásra. A laboratóriumok között átadásra kerülő módszerek esetében a húsz referenciaanyag lehetőleg legalább három laboratóriumban történő, egymástól független, különböző vizsgálatmenetei során kapott besorolási eredményeknek (ENSZ GHS/EU CLP szerinti 2. kategória vagy kategória nélküli) legalább ( $\geq$ ) 80 %-os egyezést kell mutatniuk.

#### Prediktív érték (pontosság)

12. A javasolt hasonló vagy módosított módszer pontosságának (érzékenységének, specificitásának és összesített pontosságának) a hitelesített referencia-módszer pontosságához hasonlóan, vagy annál jobbnak kell lennie, figyelembe véve a vizsgált faj esetében a relevanciára vonatkozó kiegészítő információkat is (2. táblázat). Az érzékenységnek legalább ( $\geq$ ) 80 %-osnak kell lennie (2) (8) (23). Van azonban egy további specifikus előírás az *in vitro* módszer érzékenységre vonatkozóan, amely szerint az *in vivo* 2. kategóriába tartozó kémiai anyagok közül csak az *1-dekanolt* és a *di-n-propil-diszulfidot* sorolhatja be egynél több laboratórium tévesen a kategória nélküli csoportba. A specificitásnak legalább ( $\geq$ ) 70 %-osnak kell lennie (2) (8) (23). A javasolt *in vitro* módszer specificitására vonatkozóan nincs további előírás, vagyis bármely résztvevő laboratórium bármelyik *in vivo* kategória nélküli kémiai anyagot besorolhatja tévesen, feltéve, hogy a vizsgálati módszer végleges specificitása az elfogadható tartományon belül marad. Az összesített pontosságnak legalább ( $\geq$ ) 75 %-osnak kell lennie (2) (8) (23). Bár a hitelesített referencia-módszer 1. táblázatban szereplő 20 referenciaanyagra vonatkozóan számított érzékenysége 90 %-os, a hasonló vagy módosított módszerek esetében az érvényesnek minősülő előírt minimális érzékenységi érték 80 %, mivel az *1-dekanolról* (határértéken lévő anyag) és a *di-n-propil-diszulfidról* (a hitelesített referencia-módszerrel álnegatív eredményt adó anyag) egyaránt ismert, hogy embernél nincs irritáló hatásuk (31) (32) (33), ugyanakkor nyúlón végzett vizsgálatok során irritáló hatásúnak bizonyulnak. Mivel az RhE-modelleket humán eredetű sejtekből építik fel, előfordulhat, hogy azok e vegyi anyagok esetében nem jelezik előre az irritáló hatást (ENSZ GHS/EU CLP szerinti, kategória nélküli besorolás).

## 2. táblázat

**A hasonló vagy módosított módszerek hitelesítéséhez előírt prediktív szenzitivitásra, specifikitásra és összesített pontosságra vonatkozó értékek**

Szenzitivitás	Specifikitás	Összesített pontosság
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

*A vizsgálat elfogadási kritériumai*

13. Lehetséges, hogy egy vagy több vizsgált vegyi anyaggal végzett egy vagy több vizsgálat az adott vizsgált anyag, illetve a kontrollanyagok tekintetében nem felel meg az elfogadási kritériumoknak, vagy a vizsgálat más okból nem fogadható el. A hiányzó adatok pótlása érdekében mindegyik vizsgált vegyi anyag esetében legfeljebb két további vizsgálat (»ismétlés«) fogadható el. Pontosabban, mivel a vizsgálat ismétlésekor is kell párhuzamos pozitív és negatív kontrollt vizsgálni, minden vizsgált vegyi anyagesetében legfeljebb két további vizsgálatmenet végezhető.
  14. Elképzelhető, hogy a vizsgálat megismétlése után sem sikerül minden résztvevő laboratóriumban elvégezni minden referenciaanyag esetében a legalább három érvényes vizsgálatmenetet, ami hiányos adatmátrixot eredményez. Ilyen esetekben a következő három kritériumnak kell eleget tenni ahhoz, hogy az adatkészleteket elfogadhatónak lehessen tekinteni:
    1. Mind a 20 referenciaanyagnál lennie kell legalább egy teljes vizsgálatsornak.
    2. Az egyes résztvevő laboratóriumokban a vizsgálatmenetek legalább 85 %-ának hiánytalanoknak kell lennie (a 20 anyag esetében ez azt jelenti, hogy egyetlen laboratóriumban 3 érvénytelen vizsgálat sor megengedett).
    3. Legalább három laboratóriumban az összes lehetséges vizsgálatmenet legalább 90 %-ának hiánytalanoknak kell lennie (ez 3 laboratóriumban vizsgált 20 anyag esetében azt jelenti, hogy összesen 6 érvénytelen vizsgálat sor megengedett).”
3. A melléklet a következő fejezetekkel egészül ki:

**„B.49 IN VITRO CELLULÁRIS MIKRONUKLEUSZ-VIZSGÁLAT EMLŐSÖKÖN****BEVEZETÉS**

1. Az *in vitro* mikronukleusz-vizsgálat (MNvit vizsgálat) interfázisban lévő sejtek citoplazmájában mikronukleuszok (MN) kimutatására szolgáló genotoxicitási vizsgálat. A mikronukleuszok acentrikus (vagyis centromérával nem rendelkező) kromoszómafragmentumokból származhatnak, vagy olyan ép kromoszómákból, amelyek a sejtosztódás anafázisa során nem képesek a sejtpólusokra vándorolni. A vizsgálattal klastrogén és aneugén kémiai anyagok (anyagok és keverékek) (1) (2) aktivitása mutatható ki osztódó sejteken, a vizsgált anyaggal történő expozíció során vagy azt követően. Ez a vizsgálati módszer egyaránt lehetővé teszi az aktin-polimerizációt gátló citokalazin-B-t (citoB) tartalmazó és nélküli protokollok használatát. A citoB célzott mitózist megelőző hozzáadása az egy mitotikus cikluson átesett sejtek esetében lehetővé teszi a mikronukleuszok gyakoriságának azonosítását és szelektív analízisét, mivel ezek a sejtek kétmagvúak (3) (4). Ez a vizsgálati módszer a citokinézis-gátlást nem alkalmazó protokollok használatát is lehetővé teszi, feltéve, hogy a vizsgált sejtpopuláció mitózisa bizonyítható.
2. Amellett, hogy MNvit vizsgálat alkalmazható a mikronukleuszokat indukáló vegyi anyagok (anyagok vagy keverékek) azonosítására, a citokinézis-gátlás alkalmazása, a kinetochorok immunkémiai jelölése, illetve a centroméra/teloméra próbák hibridizációja (fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)) arról is információkat nyújthat, hogy milyen mechanizmussal történt a kromoszómasérülés és a mikronukleusz-képződés (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). A jelölést és a hibridizációs technikákat akkor lehet használni, ha fokozódik a mikronukleusz-képződés, és a vizsgáló személy szeretné megállapítani, hogy ez a fokozódás klastrogén és/vagy aneugén hatásra jött-e létre.
3. A mikronukleuszok olyan károsodást jeleznek, amely átterült az utódsejtekbe, míg a metafázisban lévő sejtekben talált kromoszómaaberrációk nem feltétlenül öröklődnek. Mivel az interfázisban lévő mikronukleuszok viszonylag objektívan vizsgálhatók, a laboratóriumi személyzetnek csupán azt kell meghatároznia, hogy a sejtek átesettek-e osztódáson, és hogy hány sejt tartalmaz mikronukleuszt. Ennek következtében a preparátumok viszonylag gyorsan értékelhetők, és a vizsgálat automatizálható. Ez a gyakorlatban kezelésenként több száz helyett több ezer sejt értékelését teszi lehetővé, növelve a vizsgálat erejét. Végül megállapítható, hogy mivel a mikronukleuszok lemaradó kromoszómákból keletkezhetnek, lehetséges olyan aneuploidiókat indukáló anyagok azonosítása, amelyeket a hagyományos kromoszómaaberrációs vizsgálatokkal, például az OECD 473. vizsgálati iránymutatása (e melléklet B.10. fejezete) szerint nehéz vizsgálni (17). Az MNvit vizsgálat ugyanakkor speciális technikák, például a 2. bekezdésben leírt FISH alkalmazása nélkül nem teszi lehetővé a poliploidiót okozó és a klastrogén hatású vegyi anyagok elkülönítését.

4. Az MNvit vizsgálat *in vitro* módszer, amelyet jellemzően humán és rágsáló eredetű tenyésztett sejteken alkalmaznak. Mivel *aneugén* és *klasztogén* hatású anyagok egyaránt kimutathatóak, széleskörű alapot biztosít a kromoszóma-károsító hatás *in vitro* vizsgálatához.
5. Az MNvit vizsgálat számos különféle sejttípus esetében, valamint citoB jelenlétében és hiányában is megbízható és hatékony. Az MNvit vizsgálat hitelességét különböző rágsálósejtvonalak (CHO, V79, CHL/IU és L5178Y) és humán limfociták alkalmazásával nyert nagy mennyiségű adat támasztja alá (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Ezek közé tartoznak különösen a Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) által koordinált nemzetközi hitelesítési tanulmányok (18) (19) (20) (21) (22) és a genotoxicitás vizsgálatával foglalkozó nemzetközi műhely (International Workshop on Genotoxicity Testing) jelentései (4) (16). A rendelkezésre álló adatokat az Európai Bizottság Alternatív Módszerek Validálásával Foglalkozó Európai Központja (ECVAM) is újraértékelte egy, a bizonyítékok súlyát mérlegelő retrospektív hitelesítési vizsgálatban, és a vizsgálati módszert az ECVAM tudományos tanácsadó bizottsága (ESAC) tudományosan hitelesített módszerként jóváhagyta (32) (33) (34). A humán TK6 limfoblasztoid sejtvonal (35), HepG2 sejtek (36) (37) és szíriai aranyhórcsóg-embrió elsődleges sejtjeinek (38) felhasználását is leírták, bár ezeket hitelesítési vizsgálatok során nem használják.

#### FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

6. Az alkalmazott fogalmak meghatározása az 1. függelékben található.

#### KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

7. Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatok rendszerint szükségessé teszik a metabolikus aktiválás valamilyen exogén forrásának használatát, kivéve, ha a sejtek metabolizálják a vizsgált anyagokat. A külső metabolikus aktivációs rendszer nem utánozza teljesen az *in vivo* körülményeket. Ügyelni kell az olyan körülmények elkerülésére, amelyek műhibaként a belső mutagenitást nem tükröző pozitív eredményekhez vezetnének, és amelyek olyan tényezőkből adódhatnak, mint például a pH vagy az ozmolalitás jelentős változásai vagy a citotoxicitás magas szintje (39) (40) (41). Amennyiben a vizsgált vegyi anyag a hozzáadásakor változást idéz elő a közeg pH-jában, akkor a pH-t – lehetőleg a törzsoldat pufferolásával – úgy kell beállítani, hogy a térfogatok minden vizsgált koncentráció és minden kontroll esetében azonosak maradjanak.
8. A mikronukleuszok indukálásának vizsgálatához elengedhetetlen, hogy a kezelt és a nem kezelt tenyészetekben egyaránt mitózis menjen végbe. A mikronukleuszok számolásához az a leginformatívabb szakasz, amikor a sejt a vizsgált anyaggal végzett kezelés során vagy után egy mitózison esett át.

#### A VIZSGÁLAT ELVE

9. A humán vagy emlős eredetű sejtenyészeteket metabolikus aktiváció exogén forrásának jelenlétében és anélkül egyaránt kiteszik a vizsgált anyag hatásának, kivéve, ha megfelelő metabolizáló képességgel rendelkező sejteket használnak. A párhuzamos oldószeres/vivőanyag (VC) és pozitív kontrollanyagok (PC) minden vizsgálatához hozzátartoznak.
10. A vizsgált anyaggal végzett expozíció során vagy után a sejteket elegendő ideig kell tenyészteni ahhoz, hogy kromoszóma- vagy orsókárosodás jöhesse létre, és ez az interfázisban lévő sejtekben mikronukleuszok képződéséhez vezessen. Az aneuploidia indukálásához a vizsgált anyagnak a mitózis során a szokott módon jelen kell lennie. A mikronukleuszok jelenlétét a begyűjtött és megfestett, interfázisban lévő sejtekben vizsgálják. Ideális esetben a mikronukleuszokat csak azokban a sejtekben kell megszámolni, amelyek a vizsgált anyaggal történt expozíció során vagy – ha van ilyen – az expozíció utáni időszakban estek át mitózison. A citokinezis-gátlóval kezelt tenyészetekben ezt úgy érjük el, hogy csak a kétmagvú sejteket értékeljük. Citokinezis-gátló hiányában fontos annak bizonyítása, hogy a vizsgált sejtek valószínűleg sejtosztódáson estek át a vizsgált anyaggal végzett expozíció során vagy után. Minden protokoll esetében fontos bizonyítani, hogy a sejtproliferáció a kontroll és a kezelt tenyészetekben egyaránt végbement, és a mikronukleuszok számolásához használt tenyészetekben (vagy a párhuzamos tenyészetekben) meg kell állapítani a vizsgált anyag által kiváltott citotoxicitás vagy citosztázis mértékét.

#### A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

##### Előkészületek

11. Humán perifériás vérből származó tenyésztett primer limfociták (5) (19) (42) (43) és bizonyos rágsáló sejtvonalak, például a CHO, V79, CHL/IU és L5178Y sejtek alkalmazhatók (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Egyéb sejtvonalak és sejttípusok alkalmazását a vizsgálat során mutatott teljesítményük alapján, az Elfogadhatósági kritériumok című részben leírtak szerint kell indokolni. Mivel a mikronukleusz-képződés alapkörisége befolyásolja a vizsgálat érzékenységét, ezért alacsony, stabil mikronukleusz-képződési gyakorisággal rendelkező sejttípusok alkalmazása javasolt.

12. A limfociták kinyeréséhez a humán perifériás vért fiatal (körülbelül 18-35 éves), egészséges, nem dohányzó személytől kell venni, akiről nem ismert, hogy az utóbbi időben genotoxikus vegyi anyagoknak vagy sugárhatásnak lett volna kitéve. Amennyiben több donortól származó sejteket együtt használnak fel, akkor a donorok számát meg kell adni. A mikronukleusz-képződés gyakorisága az életkor előrehaladtával fokozódik, és ez a tendencia a nőknél erősebb, mint a férfiaknál (44), így ezt a donorsejtek gyűjtésre történő kiválasztása során figyelembe kell venni.

#### Tenyésztőközegek és tenyésztési körülmények

13. A tenyészetek fenntartásához megfelelő tenyésztőközeget és inkubálási körülményeket (tenyésztőedényeket, CO<sub>2</sub>-koncentrációt, hőmérsékletet és páratartalmat) kell biztosítani. Az igazolt sejtvonalaknál és törzseknel rutinszerűen ellenőrizni kell a modális kromoszómaszám stabilitását és a mikoplazma-fertőzés hiányát, és amennyiben a modális kromoszómaszám megváltozott, nem szabad felhasználni a tenyészetet. A vizsgálólaboratóriumban a tenyésztéshez alkalmazott normál sejtciklus idejének ismertnek kell lennie. Amennyiben citokinezis-gátlási módszer alkalmaznak, akkor a citokinezis-gátló anyag koncentrációját az adott sejttípusnak megfelelően optimalizálni kell, és bizonyítottan kell lennie, hogy az adott koncentráció az értékeléshez megfelelő számú kétmagvú sejtet eredményez.

#### Tenyészetek készítése

14. Igazolt sejtvonalak és törzsek: a törzstenyészetből származó sejteket széleszteni kell, majd tápközegben, olyan denzitásban kell tenyészteni, hogy az egy rétegben növvő tenyészetek (monolayerek) ne váljanak egybefüggővé, és a szuszpenziós tenyészetek ne érjenek el túlzott denzitást a begyűjtés előtt, majd 37 °C hőmérsékleten inkubálni kell.
15. Limfociták: a vizsgált anyaggal és a citoB-vel való expozíció előtt véralvadást gátlóval (például heparinnal) kezelt teljes vért vagy izolált limfocitákat tenyésztünk valamilyen mitogén anyag, például fitohemagglutinin (PHA) jelenlétében.

#### Metabolikus aktiváció

16. Megfelelő endogén metabolikus kapacitással nem rendelkező sejtek használata esetén exogén metabolizáló rendszereket kell alkalmazni. A leggyakrabban használt rendszer egy kofaktorról kiegészített posztmitokondriális frakció (S9), amelyet enziminduktor szerekkel, például Aroclor 1254-gyel (45) (46) vagy fenobarbiton és β-naftoflavon kombinációjával (46) (47) (48) (49) kezelt rágszálók májából állítanak elő. Ez utóbbi kombináció nem sérti a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokra vonatkozó Stockholmi Egyezményt (50) és a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról szóló 850/2004/EK rendeletet (66), és a vegyes funkciójú oxidázok indukciója terén ugyanolyan hatékonyan bizonyult, mint az Aroclor 1254 (46) (47) (48) (49). Az S9 frakciót a végleges vizsgálati tenyésztőközegekben általában az 1–10 % (v/v) közötti koncentrációtartományban alkalmazzák. A metabolikus aktivációs rendszer jellemzői függhetnek a vizsgált kémiai anyag csoportjától, és bizonyos esetekben megfelelő lehet több S9 koncentráció alkalmazása.
17. A humán vagy rágszáló eredetű aktiváló enzimeket termelő, géntechnológiával előállított sejtvonalak kiküszöbölhetik az exogén metabolikus aktivációs rendszer alkalmazásának szükségességét, és alkalmazhatók vizsgálathoz. Ilyen esetekben az alkalmazott sejtvonalra vonatkozó döntésnek – például a vegyes funkciójú oxidázoknak a vizsgált anyag metabolizmusában betöltött szerepe (51), valamint az ismert klasztogén és aneugén hatású anyagokra adott válaszreakciójuk alapján – tudományosan megalapozottnak kell lennie (lásd az Elfogadhatósági kritériumokra vonatkozó külön részt). Szem előtt kell tartani, hogy a vizsgált anyagot a termelt vegyes funkciójú oxidáz(ok) nem metabolizálhatják, ellenkező esetben ugyanis a negatív eredmények nem jelentenék azt, hogy a vizsgált anyag nem indukálja mikronukleuszok képződését.

#### A vizsgált anyag előkészítése

18. A szilárd halmazállapotú vegyi anyagokat a sejtek kezelése előtt oldószerben vagy vivőanyagban kell feloldani, és szükség esetén hígítani kell. A folyékony anyagokat közvetlenül is lehet a vizsgálati rendszerhez adagolni és/vagy a kezelés előtt hígíthatók. Gáznemű vagy illékony vegyi anyagok a szabványos protokoll megfelelő módosításával vizsgálhatók, ilyen lehet például, hogy az anyagok kezelését légmentesen lezárt edényekben kell végezni (52) (53). A vizsgált anyagból friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve, ha a stabilitási adatok a tárolás elfogadhatóságát bizonyítják.

#### Vizsgálati körülmények

##### Oldószer/vivőanyagok

19. Az oldószer/vivőanyag nem léphet reakcióba a vizsgált anyaggal, és nem befolyásolhatja a sejtek túlélőképességét vagy az S9 aktivitásának fennmaradását az alkalmazott koncentrációban. Ha nem jól bevált oldószer/vivőanyagot (például víz, sejtenyésztőközeg, dimetil-szulfoxid) alkalmaznak, akkor a választott szer alkalmazását a vizsgált anyaggal való kompatibilitást és a genotoxicitás hiányát mutató adatokkal kell alátámasztani. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát kell megfontolni.

## CitoB alkalmazása citokinezis-gátlóként

20. Az MNvit vizsgálat teljesítményét illetően az egyik legfőbb szempont annak biztosítása, hogy az értékelt sejtek a kezelés során vagy – ha volt ilyen – a kezelés utáni inkubációs periódusban mitózison essenek át. A citokinezis gátlására a legelterjedtebben alkalmazott szer a citoB, mivel gátolja az aktin kapcsolódását, ezzel megakadályozza az utódsejtek mitózis utáni szétválását, ami kétmagvú sejtek képződéséhez vezet (5) (54) (55). A mikronukleuszok számolása ezért azokra a sejtekre korlátozható, amelyek a kezelés során vagy utána átestek a mitózison. A vizsgált anyag által a sejtproliferáció kinetikájára gyakorolt hatás párhuzamosan mérhető. A citoB akkor alkalmazandó citokinezis-gátlóként, ha humán limfocitákat alkalmazunk, mivel a sejtciklusidők adott tenyészetben belüli és donorok között változóak lesznek, és nem az összes limfocita fog reagálni a PHA-ra. Egyéb módszereket alkalmazunk, ha azért vizsgáljuk a sejtvonalakat, hogy meghatározzuk, osztódtak-e az értékelt sejtek; ezek alább szerepelnek (lásd a 26. bekezdést).
21. A citoB megfelelő koncentrációját az egyes sejttípusokra vonatkozóan a laboratóriumnak kell meghatározni annak érdekében, hogy az oldószerez/vivőanyaggal kezelt kontroll tenyészetekben megfelelő gyakorisággal alakuljanak ki kétmagvú sejtek. A citoB megfelelő koncentrációja általában 3–6 µg/ml.

## A sejtproliferáció és a citotoxicitás mérése, valamint az expozíciós koncentráció kiválasztása

22. A vizsgált anyag legmagasabb vizsgálendő koncentrációjának meghatározásakor kerülni kell azokat a koncentrációkat, amelyek mellett álpozitív válaszreakciók alakulhatnak ki, ilyenek például a rendkívüli citotoxicitást kiváltó, a tenyésztőközegben kicsapódást okozó vagy a pH-ban, illetve az ozmolalításban jelentős változásokat okozó koncentrációk (39) (40) (41).
23. Mérti kell a sejtproliferációt, és ezáltal meg kell győződni arról, hogy a kezelt sejtek a vizsgálat során átestek a mitózison, és hogy a kezeléseket megfelelő szintű citotoxicitás mellett végezzük (lásd a 29. bekezdést). A citotoxicitást a metabolikus aktivitást igénylő sejtekben meg kell határozni metabolikus aktivitás mellett és anélkül is, a sejt szám relatív növekedése (RICC) vagy a relatív populációduplázódás (RPD) alapján (lásd a 2. függelék képleteit), kivéve, ha citoB-t alkalmazunk. CitoB alkalmazása esetén a citotoxicitás meghatározható a replikációs index (RI) segítségével (a képletet lásd a 2. függelékben).
24. A tenyészetek citoB-vel történő kezelése, valamint a tenyészetben található egymagvú, kétmagvú és többmagvú sejtek relatív gyakoriságainak mérése pontos módszer a kezelés sejtproliferációt előidéző és citotoxikus vagy citosztatikus hatásának mennyiségi meghatározására (5), valamint biztosítja, hogy csak a kezelés során vagy után osztódott sejtek kerüljenek értékelésre.
25. A citoB-vel végzett vizsgálatokban a citosztázis/citotoxicitás mennyiségi meghatározása a citokinezis-gátlási proliferációs indexből (CBPI) (5) (26) (56) végezhető, vagy tenyészetenként legalább 500 sejt RI-jéből (a képleteket lásd a 2. függelékben) vezethető le. Amennyiben a sejtproliferáció értékeléséhez citoB-t alkalmazunk, a CBPI-t vagy az RI-t tenyészetenként legalább 500 sejtől kell meghatározni. Többek között ezek a mérések alkalmazhatók a citotoxicitásnak a kezelt tenyészetekben és a kontrolltenyészetekben kapott értékek összehasonlításával történő becslésére. A citotoxicitás egyéb markereinek (például egybefüggőség, sejt szám, apoptózis, nekrozis, metafázis számolása) értékelése szintén hasznos információkat szolgáltathat.
26. A citoB nélkül végzett vizsgálatokban igazolni kell azt, hogy a tenyészetben értékelt sejtek a vizsgált anyaggal végzett kezelés alatt vagy az után átestek az osztódáson, ellenkező esetben álnegatív lehet a válaszreakció. Annak biztosítására, hogy az osztódott sejtek kerüljenek értékelésre, alkalmazható például a bromodezoxiuridin (BrdU) beépítése és azt követő kimutatása az osztódott sejtek azonosítása érdekében (57), a klónképződés, amikor immortalizált sejtvonalat kezelnek és értékelnek in situ tárgylemezen, mikroszkóp használatával (proliferációs index, [PI]) (25) (26) (27) (28), illetve a relatív populációduplázódás (RPD), a sejt szám relatív növekedése (RICC) vagy egyéb bizonyított igazolt módszerek (16) (56) (58) (59) (a képleteket lásd a 2. függelékben). A citotoxicitás vagy citosztázis egyéb markereinek (például egybefüggőség, sejt szám, apoptózis, nekrozis, metafázis számolása) értékelése szintén hasznos információkat szolgáltathat.
27. Legalább három elemezhető vizsgálati koncentrációt kell értékelni. Ennek érdekében szükséges lehet nagyobb számú, egymáshoz közeli koncentrációkkal végezni a kísérletet, és a mikronukleusz-képződést a megfelelő tartományba eső citotoxicitást eredményező koncentrációk alkalmazásával elemezni. Egy másik lehetséges stratégia szerint előzetes citotoxicitási vizsgálatot kell végezni és ezzel leszűkíteni a tartományt a végleges vizsgálathoz.
28. A legmagasabb koncentrációval  $55 \pm 5\%$ -os citotoxicitás előidézését kell megcélozni. Nagyobb koncentrációk a citotoxicitás másodlagos hatásaként kromozómakárosodást idézhetnek elő (60). Amennyiben citotoxicitás lép fel, a kiválasztott koncentrációknak le kell fedni az  $55 \pm 5\%$ -os citotoxicitástól kezdve a kisfokú citotoxicitáson át a citotoxicitást nem okozó koncentrációk tartományát.

29. Amennyiben citotoxicitás vagy kicsapódás nem figyelhető meg, akkor a legmagasabb vizsgált koncentrációnak 0,01 M-nak, 5 mg/ml-nek vagy 5 µl/ml-nek kell megfelelnie, attól függően, hogy melyik a legalacsonyabb érték. A vizsgálathoz kiválasztott koncentrációk között általában nem lehet 10-nél nagyobb távolság. Olyan vizsgált anyagok esetében, amelyek meredek koncentráció-válasz görbével rendelkeznek, szükséges lehet kisebb különbségeket hagyni a vizsgált anyag koncentrációi között, hogy a közepes és alacsony toxicitási tartományban lévő tenyészetek is értékelésre kerüljenek.
30. Amennyiben az oldhatóság korlátozó tényező, akkor a maximális koncentrációnak – ha nem korlátozza citotoxicitást – azt a legalacsonyabb koncentrációt kell választani, amely mellett csak minimális precipitátumok láthatók a tenyészetekben, feltéve, hogy nem zavarják az értékelést. A precipitáció értékelését például fénymikroszkópos módszerrel kell végezni, figyelembe véve azokat a precipitátumokat, amelyek a tenyésztés során tartósan megmaradtak vagy ekkor (a kezelés végéig) jelentek meg.

#### Kontrollok

31. Minden kísérletben egyidejűleg pozitív és oldószeres/vivőanyagos kontrollokat is vizsgálni kell, metabolikus aktiválással és anélkül is.
32. A pozitív kontrollok azért szükségesek, hogy igazoljuk az alkalmazott sejtek és a vizsgálati protokoll alkalmazhatóságát a klasztogén és aneugén hatású anyagok azonosítására, valamint az S9 készítmény metabolikus képességének megerősítésére. A pozitív kontrollnak a mikronukleusz-képződés ismert induktorát olyan koncentrációban kell tartalmaznia, amely a háttérértékekben várhatóan kismértékű, de reprodukálható növekedést okoz, és bizonyítja a vizsgálati rendszer érzékenységét. A pozitív kontrollok koncentrációját úgy kell kiválasztani, hogy a hatások egyértelműek legyenek, de a kiértékelő számára ne árulkodjanak azonnal a kódolt tárgylemezek tartalmáról.
33. A metabolikus kompetencia és a vizsgálati rendszer klasztogén anyagok kimutatására való képességének igazolására egyaránt metabolikus aktivációt igénylő klasztogén anyagokat (például ciklofoszfamid; benzo[a]pirén) kell alkalmazni. Indokolt esetben más pozitív kontroll is alkalmazható. Mivel a metabolikus aktivációt igénylő egyes pozitív kontrollok bizonyos kezelési körülmények mellett, illetve bizonyos sejtvonalakban exogén metabolikus aktiváció nélkül is aktívak lehetnek, ezért a metabolikus aktiváció szükségességét, valamint az S9 preparátum aktivitását a kiválasztott sejtvonalban és a kiválasztott koncentrációk mellett kell vizsgálni.
34. Jelenleg nem ismert olyan aneugén hatású anyag, amely genotoxikus aktivitásához metabolikus aktivációt igényelne (16). Az aneugén aktivitás vizsgálata során alkalmazandó jelenleg elfogadott pozitív kontroll például a kolhicin és a vinblasztin. Más vegyi anyagok is alkalmazhatók, amennyiben a mikronukleuszok képződését kizárólag, vagy elsődlegesen aneugén hatásuk révén indukálják. Annak elkerülésére, hogy metabolikus aktiváció nélkül két pozitív kontroll (a klasztogén és az aneugén hatás vizsgálatára) kelljen alkalmazni, az aneugenitást vizsgálata során alkalmazott kontroll S9 nélkül szolgálhat pozitív kontrollként, a klasztogén hatás vizsgálatához alkalmazott kontroll pedig használható az alkalmazott metabolikus aktiváló rendszer megfelelőségének vizsgálatára. Az S9 preparátumot nem igénylő sejtekben a klasztogén és az aneugén hatás vizsgálatához egyaránt szükséges pozitív kontrollt alkalmazni. A javasolt pozitív kontrollokat a 3. függelék tartalmazza.
35. Megfontolható a vegyi anyag csoportjához tartozó pozitív kontroll használata, amennyiben a megfelelő vegyi anyagok rendelkezésre állnak. Az alkalmazott pozitív kontrolloknak meg kell felelniük a sejt típusnak és az aktiválás körülményeinek.
36. Minden begyűjtési időpontban oldószeres/vivőanyagos kontrollokat kell alkalmazni. Ezenfelül kezeletlen negatív kontrollt (amelyben nincs oldószeres/vivőanyag) szintén alkalmazni kell, kivéve, ha rendelkezésre állnak olyan publikált vagy a laboratóriumban nyert régebbi kontrolladatok, amelyek igazolják, hogy a választott oldószeres az alkalmazott koncentrációban nem idéz elő genotoxikus vagy egyéb ártalmas hatásokat.

#### VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

##### A kezelés ütemterve

37. A sejtciklus meghatározott fázisában ható aneugén, illetve klasztogén anyagok azonosítási valószínűségének maximalizálása érdekében fontos, hogy a sejtciklusok valamennyi fázisa során megfelelő számú sejtet kezeljünk a vizsgált anyaggal. A kezelés ütemterve a sejtvonalak és primer sejttenyészetek esetében ezért valamelyest elérhető a limfocitákétól, amelyek mitogén stimulációt igényelnek ahhoz, hogy megkezdődjön a sejtciklus; ennek tárgyalása a 41–43. bekezdésekben szerepel (16).
38. Az elméleti megfontolások a publikált adatokkal együtt (18) azt mutatják, hogy a legtöbb aneugén és klasztogén anyagot rövid, 3–6 órás kezelési időszak alkalmazásával – S9 jelenlétében vagy hiányában – lehet kimutatni, amelyet a vizsgált anyag eltávolítása és 1,5–2,0 sejtciklusnyi szaporodási időszak követ (6). A sejteket a kezelés kezdetétől vagy végétől számítva a normál sejtciklus (vagyis a kezeletlen sejtek sejtciklusa) körülbelül 1,5–2,0-szeresének megfelelő idő elteltével kell begyűjteni (lásd az 1. táblázatot). A begyűjtési vagy visszanyerési idők meghosszabbíthatók, amennyiben ismert vagy feltételezhető, hogy a vizsgált anyag befolyásolja a sejtciklus idejét (például nukleozidanalógok vizsgálata során).

39. Az S9 preparátumok tenyésztett emlőssejtek esetében tapasztalható potenciális citotoxicitása miatt a normál sejtciklus-ido 1,5–2,0-szeresének megfelelő meghosszabbított expozíciós kezelést kizárólag S9 hiányában végeznek. Meghosszabbított kezelés esetén lehetőség kínálkozik a sejtek vizsgált vegyi anyaggal történő kezelésének citoB hiányában vagy jelenlétében történő végzésére. Ezeknek a választási lehetőségeknek azokban a helyzetekben van jelentőségük, amikor problémát jelenthet a vizsgált anyag és a citoB közötti lehetséges kölcsönhatás.
40. A sejtek kezelésének javasolt ütemtervét az 1. táblázat mutatja be. Ezek az általános kezelési ütemtervek a vizsgált anyag stabilitásától és reaktivitásától, illetve az alkalmazott sejtek konkrét szaporodási jellemzőitől függően módosíthatóak. Minden kezelésnek az exponenciális szaporodás időszakában kell kezdődnie és véget érnie. Ezeket az ütemterveket a következő, 41–47. bekezdések mutatják be részletesebben.

## 1. táblázat

## A sejtek kezelésének és begyűjtésének ideje az MNvit vizsgálat esetében

CitoB-vel kezelt limfociták, primer sejtek és sejtvonalak	+ S9	A sejteket 3–6 órán át S9 jelenlétében kezeljük; eltávolítjuk az S9-et és a kezelési közeget; friss közeget és citoB-t adunk hozzá; a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének elteltével begyűjtjük a sejteket.
	– S9 Rövid expozíció	A sejteket 3–6 órán át kezeljük; eltávolítjuk a kezelési közeget; friss közeget és citoB-t adunk hozzá; a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének elteltével begyűjtjük a sejteket.
	– S9 Meghosszabbított expozíció	»A« lehetőség: A sejteket a normál sejtciklus 1,5–2-szeresének megfelelő ideig citoB jelenlétében kezeljük; az expozíciós idő végén begyűjtjük a sejteket.  »B« lehetőség: A sejteket a normál sejtciklus 1,5–2-szeresének megfelelő ideig kezeljük; eltávolítjuk a vizsgált anyagot; friss közeget és citoB-t adunk hozzá; a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének elteltével begyűjtjük a sejteket.

CitoB nélkül kezelt sejtvonalak

(Megegyezik a fentebb ismertetett kezelési ütemtervvel, azzal a kivétellel, hogy citoB hozzáadására nem kerül sor)

CitoB-vel kezelt limfociták, primer sejtek és sejtvonalak

41. Limfociták esetében a leghatékonyabb módszer, ha a vizsgált anyaggal történő expozíciót a PHA-stimuláció után 44–48 órával kezdjük, amikor a ciklusszinkronizáció már eltűnik (5). Az első vizsgálat során a sejteket 3–6 órán át, S9 hiányában és jelenlétében kezeljük a vizsgált anyaggal. eltávolítjuk a kezelési közeget, citoB-t tartalmazó friss közeggel pótoljuk, majd a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő idő elteltével begyűjtjük a sejteket.
42. Amennyiben a rövid (3–6 órás) kezeléssel végzett mindkét első vizsgálat negatív vagy kétes eredményű, akkor meghosszabbított expozíciós idővel, S9 nélkül újabb kezelést végzünk. Kétféle kezelési lehetőség áll rendelkezésre, amelyek mindegyike egyformán elfogadott. Stimulált limfociták esetében, amelyeknél az exponenciális szaporodási fázis a stimulációt követő 96. órától csökkenhet, megfelelőbb lehet az »A« lehetőség szerint eljárni. Ezenfelül a »B« lehetőség esetében a sejtenyészeteknek a végleges mintavétel időpontjáig nem szabad egybefüggővé válniuk.
- »A« lehetőség: A sejteket a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő ideig kezeljük a vizsgált anyaggal, majd a kezelési idő végén begyűjtjük.
- »B« lehetőség: A sejteket a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő ideig kezeljük a vizsgált anyaggal. eltávolítjuk a kezelési közeget és friss közeggel pótoljuk, majd a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő további időszak elteltével begyűjtjük a sejteket.
43. A primer sejteket és sejtvonalakot a limfocitákhoz hasonló módon kell kezelni, azzal a kivétellel, hogy a PHA-val 44–48 órán át végzett stimuláció nem szükséges. A limfocitáktól eltérő egyéb sejtek esetében az expozíciót úgy kell végezni, hogy a vizsgálat befejezésének időpontjában a sejtek még a szaporodás logaritmikus fázisában legyenek.

*CitoB nélkül kezelt sejtvonalak*

44. A sejteket 3–6 órán át, S9 jelenlétében és hiányában kell kezelni. Eltávolítjuk a kezelési közeget és friss közeggel pótoljuk, majd a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő idő elteltével begyűjtjük a sejteket.
45. Amennyiben a rövid (3–6 órás) kezeléssel végzett mindkét első vizsgálat negatív vagy kétes eredményű, akkor meghosszabbított expozíciós idővel újabb kezelést végzünk (S9 nélkül). Kétféle kezelési lehetőség áll rendelkezésre, amelyek mindegyike egyformán elfogadott:
- »A« lehetőség: A sejteket a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő ideig kezeljük a vizsgált anyaggal, majd a kezelési idő végén begyűjtjük.
  - »B« lehetőség: A sejteket a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő ideig kezeljük a vizsgált anyaggal. Eltávolítjuk a kezelési közeget és friss közeggel pótoljuk, majd a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő további időszak elteltével begyűjtjük a sejteket.
46. Az egy rétegben növekvő tenyészetekben (monolayerek) a 3-6 órás kezelés végén mitotikus sejtek (ismertetőjegyük, hogy alakjuk kerek, és leválnak a felszínről) lehetnek jelen. Mivel ezek a mitotikus sejtek könnyen leválnak, a vizsgált anyagot tartalmazó közeg eltávolításakor elveszhetnek. Ügyelni kell arra, hogy a tenyészetek átmosásakor összegyűjtjük ezeket a sejteket, és visszahelyezzük a tenyészetbe, ezáltal a begyűjtéskor ne veszítsünk el mitózisban lévő és a mikronukleusz-képződés kockázatának kitett sejteket.

*A tenyészetek száma*

47. A vizsgált anyag minden koncentrációjához, valamint a vívőanyag/oldószeres és negatív kontroll tenyészetekhez két párhuzamos tenyészetet kell alkalmazni. Amennyiben a párhuzamos tenyészetek között a korábbi laboratóriumi adatok alapján csak minimális eltérések igazolhatók, elfogadható lehet egy tenyészet alkalmazása. Egy tenyészet alkalmazása esetén javasolt nagyobb számú koncentrációkat vizsgálni.

*A sejtek begyűjtése és a metszet elkészítése*

48. A begyűjtést és a feldolgozást minden tenyészetnél külön kell végezni. A sejtek előkészítéséhez hozzátartozhat a hipotóniás kezelés, ez a lépés azonban nem szükséges, ha a sejtek megfelelő szétterítése egyéb módon is elérhető. A metszetkészítés során különböző technikák alkalmazhatók, amennyiben ezek az értékeléshez jó minőségű sejtpreparátumokat eredményeznek. A sejt citoplazmáját meg kell tartani, hogy ki lehessen mutatni a mikronukleuszokat és (a citokinezis-gátlási módszer esetén) megbízhatóan azonosítani lehessen a kétmagvú sejteket.
49. A metszetek különböző módszerekkel festhetők meg, például Giemsa vagy fluoreszkáló DNS-specifikus festékekkel (59). DNS-specifikus festék (például akridin narancs (61) vagy Hoechst 33258 plusz pironin-Y (62)) használatával kiküszöbölhetők a nem DNS-specifikus festékekkel járó bizonyos műhibák. A mikronukleuszok tartalmának (kromoszóma/kromoszómafragmentum) azonosítására antikinetokor antitestek, pancentroméras DNS-próbákkal végzett FISH vagy pancentroméra-specifikus primerekkel végzett *in situ* jelölés, illetve megfelelő DNS-kontrasztfestés alkalmazható, amennyiben a mikronukleuszok keletkezésének mechanizmusára vonatkozó információkra van szükség (15)(16). A klasztogén és aneugén hatású anyagok megkülönböztetésére egyéb, korábban hatékonyan bizonyult módszerek is alkalmazhatók.

*Elemzés*

50. A mikroszkópos elemzés előtt az összes metszetet, köztük az oldószeres/vívőanyagot metszeteket és a kontrollakat is egymástól függetlenül kell kódolni. A kódolt minták hitelesített, automatikus flow citometriával vagy képelemzési rendszerrel is elemezhetők.
51. A citoB-vel kezelt tenyészetekben a mikronukleusz-képződés gyakoriságát koncentrációként legalább 2 000 kétmagvú sejt értékelésével (tenyészetként legalább 1 000 kétmagvú sejt; két tenyészet koncentrációként) kell vizsgálni. Ha csak egy tenyészetet alkalmazunk, akkor az adott tenyészetből koncentrációként legalább 2 000 kétmagvú sejtet kell értékelni. Ha az egyes koncentrációkban tenyészetként 1 000-nél vagy – egy tenyészet alkalmazása esetén – 2 000-nél jelentősen kevesebb kétmagvú sejt áll rendelkezésre, és nem mutatható ki a mikronukleuszok számának jelentős növekedése, akkor vizsgálatot szükség szerint több sejt vagy kevésbé toxikus koncentrációk alkalmazásával meg kell ismételni. Ügyelni kell arra, hogy nem szabad olyan kétmagvú sejteket értékelni, amelyek szabálytalan alakúak vagy amelyeknél nagyobb méretű a két mag, továbbá nem szabad összevetéseni a rosszul szétterített sejteket a többmagvú sejtekkel. A kettőnél több fő magot tartalmazó sejteknél nem szabad vizsgálni a mikronukleuszokat, mivel a ezekben a sejtekben magasabb lehet a mikronukleusz-képződés háttér gyakorisága (63) (64). Egymagvú sejtek értékelése elfogadható, amennyiben a vizsgált anyagról bebizonyosodott, hogy interferál a citoB aktivitásával.

52. A citoB nélkül vizsgált sejtvonalakban a mikronukleusz-képződés gyakoriságát koncentrációként legalább 2 000 sejt értékelésével (tenyészetenként legalább 1 000 sejt; két tenyészet koncentrációként) kell vizsgálni. Ha koncentrációként csak egy tenyészetet alkalmazunk, akkor az adott tenyészetből legalább 2 000 sejtet kell értékelni.
53. Amennyiben citoB-t alkalmazunk, a sejtproliferáció értékelése érdekében tenyészetenként legalább 500 sejtől meg kell határozni a CBPI-t vagy az RI-t (lásd 2. függelék). Amennyiben a kezeléseket citoB hiányában végzik, elengedhetetlen annak bizonyítása, hogy az értékelt sejtek osztódtak, amint ezt a 24–27. bekezdések is tárgyalták.

#### *Elfogadhatósági kritériumok*

54. A vizsgálati módszerben leírt MNvit tesztet alkalmazni kívánó laboratóriumnak igazolnia kell, hogy metabolikus aktivációval és anélkül, megbízhatóan és pontosan ki tudja mutatni az ismert aneugén és klasztogén hatású anyagokat, valamint az ismert negatív vegyi anyagokat a 3. függelékben felsorolt referenciaanyagok alkalmazásával. Amennyiben a vizsgálatot citoB használata nélkül végzik, akkor a vizsgálati módszer helyes elvégzésének alátámasztására a laboratóriumnak igazolnia kell, hogy a mikronukleusz-képződés vizsgálatához értékelt sejtek egy magosztódáson átesetek.
55. Referenciaanyagként történő alkalmazásra a 3. függelékben szereplő vegyi anyagok javasoltak. Helyettesítő vagy további vegyi anyagok is alkalmazhatók, ha ezek ismert hatásúak, és ugyanolyan hatásmechanizmussal indukálják a mikronukleusz-képződést, továbbá igazoltan relevánsak az MNvit eljárással vizsgálandó vegyi anyagok szempontjából. Ezt olyan hitelesítési vizsgálat elvégzésével lehet indokolni, amelyhez az anyagok széles körét alkalmazzzák vagy a vizsgált vegyi anyag kémiai csoportja vagy a vizsgált károsodás mechanizmusa alapján egy szűkebb körre összpontosítanak.
56. Az oldószeres/vivőanyag kontrollnak és a kezeletlen tenyészeteknek reprodukálhatóan alacsony és következetes mikronukleusz-képződési gyakoriságot kell produkálniuk (a 11. bekezdésben azonosított sejtípusok esetében általában 5–25 mikronukleusz/1 000 sejt). Az egyéb sejtípusok esetében a válaszreakciók eltérő tartományokba eshetnek, amelyek a sejtek MNvit vizsgálatához történő alkalmazásának hitelesítésekor meg kell határozni. A historikus kontrolltartományok megállapításához a negatív kontroll, az oldószer és a pozitív kontroll adatait kell felhasználni. A vizsgálat során párhuzamosan értékelt negatív kontrollok/pozitív kontrollok megfelelésének megítéléséhez ezeket az értékeket kell felhasználni.
57. Amennyiben a vizsgálati protokollon kisebb változtatásokat terveznek (például manuális értékelés helyett automatikus; új sejtípus használata), akkor ahhoz, hogy a módosított protokollt használatra elfogadhatónak lehessen tekinteni, a változtatás után igazolni kell a vizsgálat hatékonyságát. A hatékonyság igazolása magába foglalja annak bizonyítását, hogy a kromoszómatorés, valamint a szám feletti vagy hiányzó kromoszómák kimutathatók, és a vizsgálandó kémiai anyagok adott csoportjával vagy anyagok széles körével a vizsgálat megfelelő pozitív vagy negatív eredményeket ad.

#### **ADATOK ÉS JELENTÉS**

##### *Eredmények kezelése*

58. Amennyiben a citokinezis-gátlási technikát alkalmazzuk, a mikronukleusz-képződés indukciójának értékelése során (a mikronukleuszok sejtenkénti számától függetlenül) csak a mikronukleuszokkal rendelkező kétmagvú sejtek gyakoriságát használjuk fel. Az egy, két vagy több mikronukleusszal rendelkező sejtek pontozása hasznos információval szolgálhat, de nem kötelező.
59. Egyidejűleg az összes kezelt, illetve oldószeres/vivőanyag kontroll tenyészet esetében meg kell határozni a citotoxicitás és/vagy a citosztázis paramétereit is (58). Amennyiben a citokinezis-gátlási módszert alkalmazzuk, a kezelt és kontrolltenyészetek esetében a sejtciklus késésének mutatójaként ki kell számolni a CBPI-t vagy az RI-t. CitoB nélkül végzett vizsgálatoknál az RPD-t, az RICC-t vagy a PI-t kell alkalmazni (lásd a 2. függelék).
60. Meg kell adni a tenyészetre vonatkozó egyedi adatokat. Ezenkívül táblázatos formában az összes adatot össze kell foglalni.
61. Az MNvit vizsgálatban a mikronukleusz-képződést indukáló vegyi anyagok azért válhatnak ki ilyen hatást, mert kromoszómatorést, kromoszómavesztést vagy a kettő együttesét idézik elő. Annak vizsgálatára, hogy a mikronukleusz-képződés indukciója klasztogén és/vagy aneugén hatás eredménye-e, antikinetokor antitestekkel, centroszómáspecifikus in situ próbákkal vagy egyéb módszerekkel végzett további elemzések alkalmazhatók.

##### *Az eredmények értékelése és értelmezése*

62. Egyértelműen pozitív vagy negatív eredmény esetén nincs előírva további vizsgálat végzendő igazolás. A kétes eredmények tisztázhatók – a vizsgálat vak jellegének fenntartása érdekében – az összes tenyészetből vett újabb 1 000 sejt vizsgálatával. Ha ezzel a módszerrel nem lehet egyértelmű eredményre jutni, akkor további vizsgálatokat kell végezni. A nyomonkövetési kísérletek során mérlegelendő a vizsgálati paraméterek módosítása a vizsgálati paraméterek tartományának szükség szerinti növelésével vagy csökkentésével. A módosítható vizsgálati paraméterek közé tartozik a vizsgált koncentrációk különbsége, a sejtek begyűjtésének időzítése és/vagy a metabolikus aktiváció körülményei.

63. A pozitív eredmény kimondásának számos feltétele van, például a mikronukleuszokat tartalmazó sejtek számában bekövetkezett koncentrációfüggő vagy statisztikailag szignifikáns növekedés. Elsőként mérlegelendő az eredmények biológiai relevanciája. A válaszreakció biológiai jelentőségének értékelésekor támpontot adhat annak mérlegelése, hogy a megfigyelt értékek a kontrollokkal kapott régebbi eredmények tartományába esnek-e. A vizsgálati eredmények értékelése során segítségként megfelelő statisztikai módszerek alkalmazhatók (65). A statisztikai próbák eredményeit azonban a dózis-válasz összefüggés figyelembevételével kell értékelni. A reprodukálhatóságot és a régebbi adatokat szintén figyelembe kell venni.
64. Bár a legtöbb kísérlet egyértelmű pozitív vagy negatív eredményeket fog hozni, bizonyos esetekben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul, hogy az eredmények továbbra is többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradnak függetlenül attól, hogy hány alkalommal ismételik meg a kísérletet.
65. Az MNvit vizsgálattal kapott pozitív eredmény azt jelzi, hogy a vizsgált anyag tenyésztett emlőssejtekben kromoszómátörést vagy kromoszómavesztést indukál. A negatív eredmények azt jelzik, hogy az alkalmazott vizsgálati körülmények között a vizsgált anyag tenyésztett emlőssejtekben nem idéz elő kromoszómátöréseket és/vagy számfeletti kromoszómákat vagy kromoszómahiányt.

#### Vizsgálati jelentés

66. A vizsgálati jegyzőkönyvnek legalább a következő információkat kell tartalmaznia, amennyiben azok a vizsgálat lefolytatása szempontjából relevánsak:

##### Vizsgált vegyi anyag:

- azonosítási adatok, valamint a CAS nyilvántartási szám és EU-szám,
- fizikai jelleg és tisztaság,
- a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns fizikai-kémiai tulajdonságok,
- a vizsgált vegyi anyag reaktivitása az oldószerrel/vivőanyaggal vagy a sejtenyészethez alkalmazott tápközeggel,

##### Oldószer/vivőanyag:

- az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indoklása,
- a vizsgált anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban,

##### Sejtek:

- az alkalmazott sejtek típusa és eredete,
- az alkalmazott sejtek alkalmassága,
- adott esetben a mikoplazma-fertőzöttség hiánya,
- a sejtciklus hosszára, a duplázódási időre, illetve a proliferációs indexre vonatkozó információk,
- limfociták alkalmazása esetén adott esetben a véradók neme, életkora és száma,
- limfociták alkalmazása esetén meg kell adni, hogy teljes vér vagy szeparált limfociták expozíciója történt-e,
- adott esetben az átoltások száma,
- adott esetben a sejtenyészetek fenntartására alkalmazott módszerek,
- modális kromoszómaszám,
- a normál (negatív kontroll) sejtciklusidő,

##### Vizsgálati körülmények:

- amennyiben alkalmaznak citokinezis-gátló anyagot, annak megnevezése (például citoB), illetve koncentrációja és a sejtek expozíciójának időtartama,
- a koncentrációk kiválasztásának és a tenyészetek számának indoklása, beleértve a citotoxicitási adatokat és az oldhatóságra vonatkozó korlátokat, ha rendelkezésre állnak,

- közegek összetétele, adott esetben a CO<sub>2</sub>-koncentráció,
- a vizsgált anyag koncentrációi,
- a hozzáadott vivőanyag és vizsgált anyag koncentrációja (és/vagy térfogata),
- inkubációs hőmérséklet és idő,
- a kezelés időtartama,
- a kezelés utáni begyűjtés időpontja,
- adott esetben sejtsűrűség a leoltáskor,
- a metabolikus aktiváló rendszer típusa és összetétele, ideértve az elfogadhatósági kritériumokat,
- pozitív kontrollanyagok és negatív kontrollak,
- az alkalmazott metszetkészítési módszer és festési technika,
- a mikronukleusz azonosításának kritériumai,
- a vizsgált sejtek száma,
- a citotoxicitás mérésére alkalmazott módszerek,
- a citotoxicitás szempontjából lényeges kiegészítő információk,
- a pozitív, negatív és kétes vizsgálati eredmény kritériumai,
- az alkalmazott statisztikai elemzési módszer(ek),
- szükség esetén annak meghatározására alkalmazott módszerek, hogy a mikronukleuszok teljes kromoszómákat vagy csak kromoszómateredékeket tartalmaznak,

#### *Eredmények:*

- a citokinezis-gátlási módszer esetében az alkalmazott citotoxicitás mérése, például CBPI vagy RI meghatározásával; citokinezis-gátlási módszerek alkalmazása nélkül az RICC, RPD vagy PI meghatározása; szükség esetén egyéb megfigyelések, például a sejtek egybefüggősége, apoptózis, nekrozis, metafázis számolás, kétmagvú sejtek előfordulási gyakorisága,
- a precipitáció jelei,
- a kezelési közeg pH-jára és ozmolalítására vonatkozó adatok, amennyiben meghatározásra kerültek,
- az elemzéshez elfogadható sejtek meghatározása,
- az egymagvú, kétmagvú és többmagvú sejtek megoszlása, amennyiben citokinezis-gátlási módszert alkalmazunk,
- a mikronukleuszokkal rendelkező sejtek száma minden kezelt és kontrolltenyészetre megadva, valamint adott esetben annak meghatározása, hogy kétmagvú vagy egymagvú sejtekben található-e,
- amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés,
- a párhuzamos negatív (oldószeres/vivőanyagos) kontroll és pozitív kontroll kémiai adatai,
- a negatív (oldószeres/vivőanyagos) kontroll és pozitív kontroll historikus kémiai adatai a tartományokkal, átlagokkal, szórással és konfidenciaintervallummal (például 95 %) együtt,
- statisztikai elemzés; p-értékek, ha meghatározásra kerültek.

#### *Az eredmények tárgyalása*

#### *Következtetések*

## SZAKIRODALOM

- (1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1-4.
- (2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3-15.
- (3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233-246.
- (4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167-172.
- (5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.
- (6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193-198.
- (7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.
- (8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9-20.
- (9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297-302.
- (10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneuploids in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329-334.
- (11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205-213.
- (12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochores staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519-525.
- (13) Eastmond, D.A., Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9-20.
- (14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233-245.
- (15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211-219.
- (16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153-163.
- (17) OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [www.oecd.org/env/testguidelines]

- (18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13-36.
- (19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37-60.
- (20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelster, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61-87.
- (21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senju, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88-124.
- (22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125-152.
- (23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187-208.
- (24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45-59.
- (25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81-116.
- (26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183-190.
- (27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55-71.
- (28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res.*, 468, 137-163.
- (29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123-134.
- (30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569-580.
- (31) Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1-152.
- (32) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25<sup>th</sup> meeting, 16-17 November, 2006. Elektronikus formátumban: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>]
- (33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Elektronikus formátumban: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>]

- (34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S., van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271-283.
- (35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105-115.
- (36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B<sub>1</sub> is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257-260.
- (37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315-328.
- (38) Gibson, D.P., Brauning, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61-70.
- (39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147-205.
- (40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297-305.
- (41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.
- (42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29-36.
- (43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-block micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11-18.
- (44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31-45.
- (45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- (46) 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.
- (47) 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. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
- (48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, In: de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, 85-88.
- (49) 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.
- (50) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Elektronikus formátumban: [<http://www.pops.int/>]

- (51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247-274.
- (52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In: Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
- (53) 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. Mutagenesis* 5, 795-801.
- (54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35-44.
- (55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103-112.
- (56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to »Report from the *in vitro* micronucleus assay working group«, *Mutation Res.*, 564, 97-100.
- (57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61-65.
- (58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1-3.
- (59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169-184.
- (60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environ. Molec. Mutagenesis* 35, 191-201.
- (61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
- (62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269-275.
- (63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
- (64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65-75.
- (65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In: Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, 463-467.
- (66) Az Európai Parlament és a Tanács 850/2004/EK rendelete (2004. április 29.) a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról és a 79/117/EKG irányelv módosításáról, HL L 229., 2004.4.30., 5. o.

## 1. függelék

**Fogalom meghatározások**

**Aneugén:** olyan anyag vagy folyamat, amely a mitózissal vagy meiózissal történő sejtosztódási ciklus elemeivel kölcsönhatásba lépve a sejtek vagy organizmusok aneuploidiját eredményezi.

**Aneuploidia:** bármilyen eltérés a normális diploid (vagy haploid) kromoszómaszámtól, amely lehet egy vagy több szám feletti vagy hiányzó kromoszóma, nem tartozik viszont ide a teljes kromoszómakészlet többszöröződése (poliploidia).

**Apoptózis:** programozott sejthalál olyan lépések során keresztül, amelyek a sejt membránhoz kötött részecskékre történő szétesését eredményezik; a részecskék ezután fagocitózissal és endocitózissal kerülnek eltávolításra.

**Sejtprolifерáció:** a sejtek számának növekedése mitotikus sejtosztódással.

**Centroméra:** A kromoszóma DNS-ének azon része, ahol a két kromatida összeér, és amelyhez a két kinetokor oldalirányban kapcsolódik.

**Klasztogén:** bármilyen anyag vagy folyamat, amely a sejtek vagy organizmusok populációjában szerkezeti kromoszómakárosodásokat okoz.

**Citokinezis:** a mitózist közvetlenül követő sejtosztódási folyamat, amelynek eredményeként két utódsejt képződik egy-egy sejtmaggal.

**Citokinezis-gátlási proliferációs index (CBPI):** a kezelt populációban tapasztalható másodszor osztódó sejtek aránya a kezeletlen kontrollhoz képest (a képletet lásd a 2. függelékben).

**Citosztázis:** a sejtszaporodás gátlása (a képletet lásd a 2. függelékben).

**Citotoxicitás:** a sejt szerkezetét vagy működését károsító hatások, amelyek végső soron sejthalált idéznek elő.

**Genotoxikus:** általános kifejezés, amely magába foglalja a DNS- vagy kromoszómakárosodás valamennyi típusát, köztük a töréseket, adduktok képződését, átrendeződéseket, mutációkat, kromoszómaaberrációkat és aneuploidiát. A genotoxikus hatás nem minden típusa eredményez mutációkat vagy stabil kromoszómakárosodást.

**Interfázisban lévő sejtek:** azok a sejtek, amelyek nincsenek a mitózis fázisában.

**Kinetokor:** protein tartalmú struktúra, amely a kromoszóma centroméra részén épül fel, és amelyhez az orsórostok a sejtosztódás során kötődnek, lehetővé téve a leánykromoszómák szabályos mozgását az utódsejtek pólusaihoz.

**Mikronukleuszok:** kis magvak, amelyek a sejtmagtól külön, azon felül találhatóak a sejtekben, és a mitózis vagy meiózis telofázisa során, lemaradó kromoszómátöredékek vagy teljes kromoszómák révén képződnek.

**Mitózis:** a sejtmag osztódása, amely általában profázisra, prometáfázisra, metafázisra, anafázisra és telofázisra osztható fel.

**Mitotikus index:** a metafázisban lévő sejtek aránya osziva a sejtpopulációban megfigyelt sejtek összes számával; az adott populációban a sejtproliferáció fokát jelzi.

**Mutagén:** örökletes elváltozást idéz elő a génekben lévő DNS-bázispár szekvenciában vagy szekvenciákban vagy a kromoszómák szerkezetében (kromoszómaaberrációk).

**Nondiszjunkció:** a kromatidpárok nem válnak szét, és különülnek el a kifejlődő utódsejtekbe, rendellenes kromoszómaszámmal rendelkező utódsejteket eredményezve.

**Poliploidia:** ellentétben a csak egyetlen kromoszómát vagy bizonyos kromoszómákat érintő számbeli rendellenességekkel (aneuploidia), poliploidia esetében a teljes kromoszómakészlet(ek) számbeli rendellenessége áll fenn.

**Proliferációs index (PI):** a citotoxicitás mérésére használható módszer olyan esetekben, amikor nem alkalmaznak citoB-t (a képletet lásd a 2. függelékben).

**A sejtszám relatív növekedése (RICC):** a citotoxicitás mérésére használható módszer olyan esetekben, amikor nem alkalmaznak citoB-t (a képletet lásd a 2. függelékben).

**Relatív populációduplázódás (RPD):** a citotoxicitás mérésére használható módszer olyan esetekben, amikor nem alkalmaznak citoB-t (a képletet lásd a 2. függelékben).

**Replikációs index (RI):** a kezelt tenyészetben tapasztalható sejtciklusok aránya a kezeletlen kontrollhoz képest, az expozíciós időszakban és a helyreállás időszakában (a képletet lásd a 2. függelékben).

**Vizsgált vegyi anyag (más néven vizsgált anyag):** Bármely anyag vagy keverék, amelyet ezzel a vizsgálati módszerrel vizsgálnak.

## 2. függelék

## A citotoxicitás értékelésére szolgáló képletek

1. *CitoB alkalmazása esetén* a citotoxicitás értékelését a citokinezis-gátlási proliferációs index (CBPI) vagy replikációs index (RI) alapján kell végezni (16) (58). A CBPI a citoB-expozíció időszaka alatt megmutatja a sejtenkénti sejtciklusok átlagos számát, így alkalmazható a sejtproliferáció kiszámítására. Az RI a kezelt tenyészetekben a sejtmagok viszonylagos számát mutatja meg a kontroll tenyészetekhez képest, így alkalmazható a %-os citosztázis kiszámítására:

$$\% \text{-os citosztázis} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

valamint:

T = a vizsgált vegyi anyaggal kezelt tenyészet

C = vivőanyagot kontrolltenyészet

ahol:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{egymagvú sejtek száma}) + (2 \times \text{kétmagvú sejtek száma}) + (3 \times \text{többmagvú sejtek száma}))}{(\text{sejtek száma összesen})}$$

Tehát az 1-es CBPI (az összes sejt egymagvú) 100 %-os citosztázisnak felel meg.

$$\text{Citosztázis} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{kétmagvú sejtek száma}) + (2 \times \text{többmagvú sejtek száma})) \div (\text{sejtek összes száma})_T}{((\text{kétmagvú sejtek száma}) + (2 \times \text{többmagvú sejtek száma})) \div (\text{sejtek összes száma})_C} \times 100$$

T = kezelt tenyészetek

C = kontrolltenyészetek

2. Tehát az 53 %-os RI azt jelenti, hogy a kontroll tenyészetben kétmagvú és többmagvú sejtekké osztódott sejtek számához képest a kezelt tenyészetben ennek csak 53 %-a osztódott, vagyis a citosztázis 47 %-os.

3. Amennyiben *citoB-t nem alkalmaznak*, a citotoxicitás értékelésére a sejtszám relatív növekedése (RICC) vagy a relatív populációduplázódás (RPD) ajánlott (58), mivel mindkét módszer figyelembe veszi az osztódott sejtpopuláció arányát.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{a sejtszám növekedése a kezelt tenyészetekben (végső - kiindulási)})}{(\text{a sejtszám növekedése a kontrolltenyészetekben (végső - kiindulási)})} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{a populáció duplázódásának száma a kezelt tenyészetekben})}{(\text{a populáció duplázódásának száma a kontrolltenyészetekben})} \times 100$$

ahol:

$$\text{Populációduplázódás} = [\log (\text{kezelés utáni sejtszám} \div \text{kiindulási sejtszám})] \div \log 2$$

4. Tehát az 53 %-os RICC vagy RPD 47 %-os citotoxicitást/citosztázist jelez.

5. Proliferációs index (PI) alkalmazásával a citotoxicitás az 1 sejtől (c1), 2 sejtől (c2), 3-4 sejtől (c4) és 5-8 sejtől (c8) álló telepek megszámlálásával határozható meg.

$$\text{PI} = \frac{((1 \times \text{c1}) + (2 \times \text{c2}) + (3 \times \text{c4}) + (4 \times \text{c8}))}{(\text{c1} + \text{c2} + \text{c4} + \text{c8})}$$

6. A PI-t a citotoxicitás értékes és megbízható paramétereként alkalmazzák a citoB nélkül *in situ* tenyésztett sejtvonalak esetében is (25) (26) (27) (28).

## 3. függelék

A teljesítmény értékeléséhez ajánlott referenciaanyagok <sup>(1)</sup>

Kategória	Vegyí anyag	CAS-szám	EU-szám
1. Metabolikus aktiváció nélkül is aktív klasztogének			
	Citozin-arabinozid	147-94-4	205-705-9
	Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
2. Metabolikus aktivációt igénylő klasztogének			
	Benzo(a)pirén	50-32-8	200-028-5
	Ciklofoszfamid	50-18-0	200-015-4
3. Aneugén anyagok			
	Kolhicin	64-86-8	200-598-5
	Vinblasztin	143-67-9	205-606-0
4. Negatív anyagok			
	Di-(2-etilhexil)-ftalát	117-81-7	204-211-0
	Nalidixsav	389-08-2	206-864-7
	Pirén	129-00-0	204-927-3
	Nátrium-klorid	7647-14-5	231-598-3

<sup>(1)</sup> A referenciaanyagok a használatra ajánlott vegyi anyagokat képviselik. A referenciaanyagok listájában szereplő vegyi anyagok akkor helyettesíthetők vagy egészíthetők ki, ha azok hatása ismert, ugyanolyan hatásmechanizmussal indukálják a mikronukleusz-képződést, és igazoltan relevánsak az MNvit eljárással vizsgálandó vegyi anyagok szempontjából. A céltól függően olyan hitelesítési vizsgálat végzése is indokolhatja ezt, amelyhez az anyagok széles körét alkalmazzák vagy a vizsgált anyag kémiai csoportja vagy a vizsgált károsodás mechanizmusa alapján egy szűkebb körre összpontosítanak.

**B.50. BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER (LLNA): DA**

## BEVEZETÉS

- Az OECD vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozó iránymutatásait és az uniós vizsgálati módszereket időnként felülvizsgálják a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és állatjóléti megfontolások fényében. A bőrszenzibilizáció egereknél történő meghatározására szolgáló első vizsgálati módszer (B.42.), a lokális nyirokcsomó-vizsgálat (LLNA; az OECD 429. vizsgálati iránymutatása) átdolgozásra került (1). Az LLNA hitelesítésének részleteit és az ezzel kapcsolatos munka áttekintését publikálták (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Az LLNA során a limfociták proliferációjának mérése radioizotópos timidin vagy jódtól alkalmazásával történik, ezért amennyiben a radioaktív anyagok beszerzése, használata vagy ártalmatlanítása problémát jelent, a vizsgálat csak korlátozottan alkalmazható. Az LLNA: DA (a Daicel Chemical Industries, Ltd. fejlesztése) az LLNA nem radioaktív változata, amely az adenzin-trifoszfát (ATP) tartalom mennyiségi meghatározását biolumineszcencia útján végzi, amely alkalmazható a limfocitaproliferáció indikátoraként. Az LLNA: DA vizsgálati módszert egy szakértőkből álló nemzetközi értékelő testület hitelesítette, vizsgálta felül és ajánlotta olyan módszerként, amely a bőrszenzibilizációt okozó, illetve nem okozó vegyi anyagok meghatározására bizonyos megkövetésekkel hasznosnak tekinthető (10) (11) (12) (13). A vizsgálati módszer célja a vegyi anyagok (anyagok és keverékek) bőrszenzibilizáló hatásának állapotknál történő felmérése. E melléklet B.6. fejezete és az OECD 406. vizsgálati iránymutatása tengerimalac-vizsgálatokat alkalmaz, nevezetesen a tengerimalac-maximizációs módszert és Böhler-vizsgálatot (14). Az LLNA (e melléklet B.42. fejezete; az OECD 429. vizsgálati iránymutatása) és a két nem radioaktív módosított eljárás, az LLNA: DA (e melléklet B.50. fejezete; az OECD 442. A. vizsgálati iránymutatása) és az LLNA: BrdU-ELISA (e melléklet B.51. fejezete; az OECD 442. B. vizsgálati iránymutatása) egyaránt előnyösebb a B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában (14) szereplő tengerimalac-vizsgálatnál abból a szempontból, hogy kevesebb állat használatát igényli és kíméletesebb.
- Az LLNA-hoz hasonlóan az LLNA: DA is a bőrszenzibilizáció indukciós fázisát vizsgálja, és a dózis-válasz értékelésére alkalmas mennyiségi adatokat szolgáltat. Emellett azáltal, hogy a bőrszenzibilizáló anyagokat a DNS radioaktív jelölése nélkül lehet kimutatni, a munka során kiküszöbölhető a radioaktivitásnak való kitétség, valamint a hulladék ártalmatlanításának problémája. Ez viszont az egerek nagyobb arányú használatát jelentheti a bőrszenzibilizáló anyagok kimutatására, ami a bőrszenzibilizáló képesség vizsgálata során tovább csökkenthetné a tengerimalacok használatát (pl. B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (14).

## FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

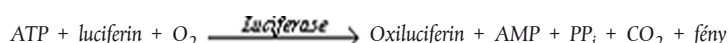
- Az alkalmazott fogalmak meghatározása az 1. függelékben található.

## KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. Az LLNA: DA egy módosított LLNA módszer, amely bizonyos korlátozások mellett a potenciális bőrszenzibilizáló vegyi anyagok azonosítására szolgál. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy az LLNA vagy a tengerimalac-vizsgálat (lásd B.6. fejezet, az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (14) helyett minden esetben az LLNA: DA-t kell alkalmazni, inkább azt, hogy ez a vizsgálati módszer ugyanolyan hasznos, és olyan alternatív módszerként alkalmazható, amely esetében a pozitív és negatív eredmények általában már nem igényelnek további megerősítést (10) (11). A vizsgálat elvégzése előtt a vizsgáló laboratóriumnak a vizsgált anyagról rendelkezésre álló összes adatot figyelembe kell vennie. Ezen információk közé tartozik a vizsgált anyag azonosítása, kémiai szerkezete, fizikai-kémiai tulajdonságai, valamint a vizsgált anyaggal korábban végzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei és a szerkezeti rokon vegyi anyagok toxikológiai adatai is. Mindezen információk figyelembevételével dönthető el, hogy az LLNA: DA módszer alkalmazható-e a vizsgált anyag esetében (tekintve, hogy bizonyos vegyi anyag-típusoknál inkompatibilitás áll fenn [lásd az 5. bekezdést]), és milyen dózist célszerű választani a vizsgálatokhoz.
5. Az LLNA: DA *in vivo* módszer, következésképpen nem küszöbölhető ki vele az állatok felhasználása az allergiás kontakt szenzibilizáló hatás vizsgálata során. Ugyanakkor a tengerimalac-vizsgálatokhoz képest (B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) lehetővé teszi az állatok ilyen célú felhasználásának csökkentését (14). Továbbá az állatok kontakt szenzibilizációs vizsgálatok során történő felhasználásának módját tekintve az LLNA: DA jelentősen kíméletesebb (kevesebb fájdalmat és szenvedést okoz), mivel a B.6. fejezet és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásával ellentétben az LLNA: DA esetében nincs szükség indukált bőr-hiperszenzitivitási reakciók előidézésére. A B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában foglalt módszerrel (14) szembeni előnyei ellenére az LLNA: DA módszernek vannak bizonyos korlátai, amelyek szükségessé tehetik a B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában foglaltak alkalmazását (pl. bizonyos fémek vizsgálata, állpozitív eredmények bizonyos bőrirritáló anyagokkal [például bizonyos felületaktív anyagokkal] (6) [1, illetve e melléklet B.42. fejezete], vagy a vizsgált anyag oldhatósága). Továbbá az olyan funkcionális csoportokat tartalmazó anyagcsoportok, illetve anyagok, amelyek potenciális zavaró tényezőként szerepelnek (16) szükségessé tehetik a tengerimalac-vizsgálatok (vagyis a B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása (14)) használatát. Az LLNA esetében megállapított korlátozásokat (1, illetve e melléklet B.42. fejezete) az LLNA: DA módszerre is ajánlott alkalmazni (10). Ezenkívül az LLNA: DA módszer nem feltétlenül alkalmas olyan anyagok vizsgálatára, amelyek befolyásolják az ATP szintjét (például ATP-gátlóként ható anyagok) vagy az intracelluláris ATP pontos mérését (például az ATP-t bontó enzimek jelenléte vagy extracelluláris ATP jelenléte a nyirokcsomóban). E meghatározott hiányosságokon kívül, az LLNA: DA bármilyen anyag vizsgálatára megfelelő, kivéve, ha ezek az anyagok olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek befolyásolják az LLNA: DA pontosságát. Emellett abban az esetben, ha a stimulációs indexre (SI) kapott érték 1,8 és 2,5 közé esik figyelembe kell venni a határértéken lévő pozitív eredmények lehetőségét is (lásd a 31–32. bekezdést). Ez egy legalább 1,8 értékű stimulációs indexszel rendelkező, 44 anyagot magában foglaló hitelesítési adatbázison alapul (lásd a 6. bekezdést), amely esetében az LLNA: DA módszer helyesen azonosította mind a 32, az LLNA módszer szerint szenzibilizáló anyagot, de hibásan azonosított három anyagot az LLNA módszerrel nem szenzibilizálóként meghatározott, 1,8 és 2,5 közötti SI-értékkel (vagyis határértéken lévő pozitív) rendelkező 12 anyagok közül (10). Mivel azonban az SI-értékek beállításához és a vizsgálat prediktív jellemzőinek kiszámításához ugyanazt az adatállományt alkalmazták, a megadott eredmények túlbecsülhetik a valós prediktív jellemzőket.

## A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

6. Az LLNA: DA módszer hátterében az az alapelv áll, hogy a szenzibilizáló anyagok elsődleges limfocitaproliferációt indukálnak a vizsgált anyag alkalmazási területének nyirokvezetéséről gondoskodó nyirokcsomókban. Ez a proliferáció arányos az alkalmazott allergén dóziséval és erősségével, valamint egyszerű módszert biztosít a szenzibilizáció kvantitatív méréséhez. A proliferációt úgy méri, hogy a vizsgálati csoportokban mért átlagos proliferációt összehasonlítják a vivőanyaggal kezelt csoportban mért proliferációval. Meghatározzák az egyes kezelt csoportokban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokban mért átlagos proliferáció arányát, amelyet stimulációs indexnek (SI) neveznek, és amelynek legalább  $\geq 1,8$ -nek kell lennie ahhoz, hogy indokolt legyen a vizsgált anyag potenciális bőrszenzibilizáló anyagként történő további vizsgálata. Az itt leírt eljárások az ATP tartalom biolumineszcenciával történő mérésén alapulnak (az ATP-ről ismert, hogy korrelál az élő sejtek számával) (17), amely az elvezető aurikuláris nyirokcsomókban lévő proliferáló sejtek számának növekedését jelzi (18) (19). A biolumineszcencia módszer során alkalmazott luciferáz enzim ATP-ből és luciferinből fény képződését katalizálja a következő reakció lezajlásával:



A kibocsátott fény intenzitása lineáris összefüggést mutat az ATP koncentrációjával, és luminométerrel mérhető. A luciferin-luciferáz vizsgálat széles körben alkalmazott, érzékeny módszer az ATP mennyiségi meghatározására (20).

## A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

## Az állatfaj kiválasztása

7. Ehhez a vizsgálathoz az egér a választandó faj. Az LLNA: DA módszerhez a hitelesítési vizsgálatokat kizárólag a CBA/J törzzsel végezték, amely ezért preferált törzsnak tekintendő (12) (13). Fiatal felnőtt nullipara és nem vemhes nőstény egereket kell használni. A vizsgálat elején az állatok korának 8-12 hetnek kell lennie, az állatok testtömege között az eltérésnek minimálisnak kell lennie, és a testtömeg nem haladhatja meg az átlagos testtömeg 20 %-át. Ha elegendő adat áll rendelkezésre arra nézve, hogy az LLNA: DA módszerrel kapott válaszreakcióban nincsenek jelentős törzs- és/vagy ivarspecifikus különbségek, akkor más törzsek, illetve hím állatok is alkalmazhatók.

### Az állatok tartásának és etetésének körülményei

8. Az egereket csoportosan kell tartani (21), kivéve, ha az egyedenkénti tartásra megfelelő tudományos indok merül fel. A kísérleti állatok tartásául szolgáló helyiség hőmérsékletének  $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ -nak kell lennie. Noha a helyisége relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem haladhatja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos, 12 órás sötét periódusok váltakozásával. Az etetéshez a szokásos laboratóriumi takarmány alkalmazható korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

### Az állatok előkészítése

9. Az állatokat véletlenszerűen választják ki, majd egyedi azonosítóval látják el (viszont az állat fülén semmiféle azonosító nem alkalmazható), és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben tartják őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez. A kezelés megkezdése előtt minden állatot megvizsgálunk, hogy meggyőződjenek arról, nincs rajtuk látható bőrsérülés.

### A dózisok előkészítése

10. A szilárd halmazállapotú vegyi anyagokat az egér fülén történő alkalmazás előtt oldószerben/vivőanyagban kell feloldani vagy szuszpendálni, és szükség esetén hígítani kell. A folyadék halmazállapotú vegyi anyagokat hígítatlanul vagy az adagolás előtt hígított formában lehet alkalmazni. A nem oldható vegyi anyagokat, például az orvosi eszközökben általánosan előforduló anyagokat megfelelő oldószerben történő agresszív extrakciónak kell kitenni, hogy a vizsgálat során az egér fülén való alkalmazás előtt az összes kivonható összetevőt feltárjuk. A vizsgált anyagokat naponta kell elkészíteni, kivéve, ha stabilitási adatok igazolják, hogy a tárolás elfogadható.

### A megbízhatóság ellenőrzése

11. A vizsgálat megfelelő teljesítményének megfelelő és reprodukálható szenzitivitással adott válaszreakciókkal történő igazolására pozitív kontrollanyagokat (PK) alkalmaznak olyan szenzibilizáló tesztanyagként, amelynek a válaszreakció mértéke pontosan meghatározott. Pozitív kontroll párhuzamos vizsgálata ajánlott, mert ez igazolja, hogy a laboratórium megfelelő szakértelemmel végzi az egyes vizsgálatokat, és lehetővé teszi a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság és összehasonlíthatóság értékelését. Néhány szabályozó hatóság szintén előírja a pozitív kontroll minden vizsgálat során történő alkalmazását, ezért az LLNA: DA módszer elvégzése előtt ajánlott egyeztetni az illetékes hatóságokkal. Ennek megfelelően javasolt a pozitív kontroll rutinszerű párhuzamos vizsgálata, hogy elkerülhetőek legyenek az olyan további állatkísérletek, amelyeket a pozitív kontrollt csak időszakosan alkalmazó laboratórium az előírásoknak való megfelelés érdekében végezne (lásd a 12. bekezdést). A pozitív kontrollnak az LLNA: DA módszerrel olyan expozíciós szint mellett kell pozitív válaszreakciót adnia, amely a negatív kontrollcsoporthoz (NK) képest várhatóan legalább 1,8-del növeli a stimulációs indexet (SI). A pozitív kontroll dózist úgy kell megválasztani, hogy ne okozzon túlzott bőrirritációt vagy szisztémás toxicitást, és az indukció reprodukálható, de ne túl nagymértékű legyen (például  $SI > 10$  már túlzottnak tekinthető). Az előnyben részesítendő pozitív kontrollanyagok a 25 %-os hexil-cinnemaldehid (Chemical Abstracts Service [CAS] szám: 101-86-0) és a 25 %-os eugenol (CAS-szám: 97-53-0) aceton:olívaolaj (4:1, v/v) arányú keverékében. Adódhatnak olyan körülmények, amelyek fennállásakor, megfelelő indoklás esetén a fenti kritériumoknak megfelelő más pozitív kontrollanyagok is alkalmazhatók.
12. Bár ajánlott a pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata, lehetnek azonban olyan helyzetek, amikor a pozitív kontroll időszakos (például legalább 6 havonta végzett) vizsgálata elfogadható lehet az LLNA: DA vizsgálatot rendszeresen (vagyis legalább havonta egyszeri gyakorisággal) végző laboratóriumok esetében, amelyek rendelkeznek pozitív kontrollok igazolt, historikus adatbázisával, és ezzel bizonyítható, hogy a laboratórium a pozitív kontrollokkal képes reprodukálható és pontos eredményeket előállítani. Az LLNA: DA módszerben való jártasság alátámasztható a pozitív kontrollal megfelelő időszakon belül (kevesebb mint egy éve) végzett legalább 10 független vizsgálat során kapott következetesen pozitív eredményekkel.
13. Pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata minden alkalommal szükséges, valahányszor az LLNA: DA vizsgálati módszerében változtatást hajtanak végre (például a képzett személyzet, a vizsgálati eljárás során használt anyagok és/vagy reagensek, a vizsgálati eszközök, a kísérleti állatok beszerzési forrásának megváltoztatása), és ezeket a változásokat dokumentálni kell a laboratóriumi jelentésekben. Figyelembe kell venni, hogy ezek a változtatások mennyiben befolyásolják a korábban létrehozott historikus adatbázis megfelelését, és el kell dönteni, hogy szükséges-e új historikus adatbázis felállítását a pozitív kontroll eredményei következetességének dokumentálása érdekében.
14. A vizsgálatot végző személyeknek tisztában kell lenniük azzal, hogy amennyiben a párhuzamos vizsgálat helyett a pozitív kontrollok időszakos vizsgálata mellett döntenek, ez hatással lehet a pozitív kontrollok időszakos vizsgálata közötti időszakokban, párhuzamos pozitív kontroll vizsgálata nélkül előállított negatív vizsgálati eredmények megfelelésére és elfogadhatóságára. Ha például a pozitív kontrollal végzett időszakos vizsgálat álnegatív eredményt adott, akkor megkérdőjelezhetőek azok a negatív eredmények, amelyek az utolsó elfogadható eredményű és az elfogadhatatlan eredményű időszakos pozitív kontroll vizsgálat között eltelt időszakban keletkeztek. Az ilyen következmények jelentőségét körültekintően mérlegelni kell annak eldöntésekor, hogy pozitív kontrollokat párhuzamosan vagy csak időszakosan vizsgáljanak-e. Szintén megfontolandó a kevesebb állat használata a párhuzamos pozitív kontrollcsoportban, amennyiben ez tudományosan indokolt, és a laboratóriumra specifikus historikus adatok alapján a laboratórium igazolja, hogy megfelelő a kevesebb egér használata (22).

15. Bár a pozitív kontrollt olyan vivőanyagban kell vizsgálni, amelyről ismert, hogy következetes válaszreakciót vált ki (például aceton:olívaolaj; 4:1, v/v arányú keveréke), lehetnek olyan szabályozási helyzetek, amikor nem szokványos vivőanyagokban (klinikailag/kémiaiilag releváns készítmény) történő vizsgálat elvégzésére is szükség van (23). Amennyiben a párhuzamos pozitív kontrollt a vizsgált anyagétól eltérő vivőanyagban vizsgálják, akkor a párhuzamos pozitív kontrollal együtt egy külön vivőanyagot is vizsgálni kell.
16. Azokban az esetekben, amikor egy bizonyos vegyi csoportba tartozó anyagokat vagy a válaszreakciók tartományát értékelik, szintén hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása annak igazolására, hogy a vizsgálati módszer megfelelően működik az ilyen típusú anyagok bőrszenzibilizáló hatásának kimutatására. A megfelelő referenciaanyagoknak a következő tulajdonságokkal kell rendelkezniük:
- szerkezeti és funkcionális hasonlóság a vizsgált anyag csoportjával,
  - ismert fizikai/kémiai tulajdonságok,
  - az LLNA: DA módszerrel kapott alátámasztó adatok,
  - egyéb állatmodellekből és/vagy emberből származó alátámasztó adatok.

## VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

### Az állatok száma és a dózisszintek

17. Minden dóziscsoportban legalább négy állatot kell használni, és a vizsgált anyagból legalább három különböző koncentrációt, továbbá párhuzamos negatív kontrollcsoportot, amelyet csak a vizsgált anyaghoz használt vivőanyaggal kezelnek, valamint egy pozitív kontroll csoportot kell alkalmazni (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11–15. bekezdésben foglaltakat). Megfontolandó a pozitív kontroll többféle dózisének vizsgálata, különösen, ha a pozitív kontroll vizsgálatát időszakosan végzik. A kontrollcsoportban lévő állatokkal ugyanúgy kell bánni és dolgozni, mint a kezelt csoportokban lévőkkel, azzal a kivétellel, hogy az állatokat nem kezelik a vizsgált anyaggal.
18. A dózist és a vivőanyagot a (2) és (24) számú hivatkozásokban megadott ajánlások alapján kell kiválasztani. Az egymás utáni dózisek kiválasztása általában megfelelő koncentrációsorból, például 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % stb. történik. Az alkalmazott koncentrációsor megfelelő tudományos megfontolások alapján kell kiválasztani. A három egymás utáni koncentráció kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált anyagról esetlegesen rendelkezésre álló valamennyi toxikológiai információt (például akut toxicitás és bőrirritáció), valamint szerkezeti és fizikai-kémiai adatot, hogy a legmagasabb koncentrációval a lehető legnagyobb expozíciót idézzük elő, amely még nem okoz szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű lokális bőrirritációt (24) (25). Ilyen jellegű információk hiányában szükséges lehet a megelőző előszűrő vizsgálat (lásd 21–24. bekezdés).
19. A vivőanyagoknak nem szabad megzavarnia vagy befolyásolnia a vizsgálat eredményét, és aszerint kell kiválasztani, hogy a vizsgált anyag oldhatósága a lehető legnagyobb koncentráció elérése érdekében maximális legyen, ugyanakkor a vizsgált anyag felvitelére alkalmas oldatot/szuszpenziót kapjunk. A javasolt vivőanyagok az aceton:olívaolaj (4:1 v/v) keveréke, N,N-dimetilformamid, metil-etil-keton, propilén-glikol és dimetil-szulfoxid (6), de megfelelő tudományos indoklás esetén más vivőanyagok is alkalmazhatók. Bizonyos esetekben további kontrollként szükséges lehet valamely klinikai szempontból releváns oldószer használata, vagy annak a kereskedelmi formulának az alkalmazása, amelyben a vizsgált anyagot forgalomba hozzák. Különösen vigyázni kell arra, hogy megfelelő szolubilizáló szerek (pl. 1 % Pluronic® L92) alkalmazásával a hidrofil anyagokat olyan vivőanyag-rendszerbe építsük be, amely benedvesíti a bőrt, de nem folyik le azonnal. A teljesen vizes alapú vivőanyagokat tehát kerülni kell.
20. A nyirokcsomók egyedenként történő feldolgozása lehetővé teszi az egyedek közötti variabilitás, valamint a vizsgált anyaggal és a vivőanyaggal kezelt csoport eredményeinek statisztikai összehasonlítását (lásd a 33. bekezdést). Emellett csak akkor lehet értékelni, hogy lehetséges-e csökkenteni a pozitív kontrollcsoportban lévő egerek számát, ha az egyedi állatokra vonatkozóan gyűjtünk adatokat (22). Ezen túlmenően, egyes szabályozó hatóságok is megkövetelik az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtést. Az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtés rendszeresítése állatjóléti előnyökkel jár azáltal, hogy elkerülhető a vizsgálatok megismétlése abban az esetben, amikor a vizsgált anyagról eredetileg csak egyféleképpen gyűjtötték az adatokat (pl. összevont állatkísérletes adatok), míg a szabályozó hatóság később eltérő követelményeket állít fel (pl. egyedi állatokon alapuló adatok).

### Előszűrő vizsgálat

21. A legmagasabb vizsgálandó dózis meghatározását lehetővé tevő információ hiányában (lásd a 18. bekezdést) az LLNA: DA módszerhez alkalmazandó megfelelő dózisszint megállapítása érdekében előszűrő vizsgálatot kell végezni. Az előszűrő vizsgálat célja, hogy támpontot adjon az LLNA: DA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózis kiválasztásához, amennyiben a szisztémás toxicitást (lásd a 24. bekezdést) és/vagy nagyfokú bőrirritációt (lásd a 23. bekezdést) okozó koncentrációra vonatkozó információk nem állnak rendelkezésre. Folyadékok esetében a legmagasabb vizsgált dózissnak 100 %-os koncentrációnak kell lennie, szilárd anyagok vagy szuszpenziók esetében pedig a lehetséges maximális koncentrációnak.

22. Az előszűrő vizsgálatot a fő LLNA: DA vizsgálatához hasonló körülmények között kell végezni, eltekintve attól, hogy nem kell a nyirokcsomó proliferációt értékelni, valamint dóziscsoportonként kevesebb állat használható. Dóziscsoportonként egy vagy két állat javasolt. Az egereket a szisztémás toxicitás, illetve az alkalmazás helyén fellépő helyi irritáció jeleinek szempontjából naponta megfigyelik. A testtömeget a vizsgálat előtt és az állat exterminálása előtt is (8. nap) feljegyzik. A bőrpírt az egerek mindkét fülén vizsgálják és pontozzák az 1. táblázat (25) szerint. A fülvastagság értékeit egy vastagságmérővel (például digitális mikrométer, vagy Peacock Dial vastagságmérő) állapítják meg az 1. napon (az adagolás előtt), a 3. napon (hőzzávetőleg 48 órával az első dózis után), valamint a 7. napon (az exterminálás előtt 24 órával) és a 8. napon. A 8. napon a fülvastagságot ezen kívül a fülből lyukasztással eltávolított szövet tömegének meghatározásával is meg lehet állapítani, amit az állat exterminálása után kell elvégezni. Nagyfokú helyi irritációnak minősül a legalább  $\geq 3$ -as pontszámú bőrpír és/vagy legalább  $\geq 25$  %-os fülvastagság a vizsgálat bármely napján (26) (27). A fő LLNA: DA vizsgálatához azt a dózist kell maximális dózisként választani, amely az előszűrés során alkalmazott koncentráció sorban (lásd a 18. bekezdést) a szisztémás toxicitást és/vagy nagyfokú helyi bőrirritációt okozó koncentrációnál eggyel alacsonyabb.

## 1. táblázat

**Bőrpír (erythema) pontszámai**

Megfigyelés	Pontszám
Nincs erythema	0
Nagyon enyhe erythema (alig észlelhető)	1
Jól körülírt erythema	2
Közepes-súlyos erythema	3
Súlyos (céklavörös elszíneződés), pörkképződéig terjedő erythema, amely lehetetlenné teszi az erythema besorolását	4

23. A 25 %-os fülvastagság-növekedésen felül (26) (27), a bőrirritáló anyagok LLNA módszerrel végzett kimutatásához a kezelt állatok fülvastagságának kontrollcsoporthoz viszonyított statisztikailag szignifikáns növekedését is használják (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Noha 25 % alatti fülvastagság esetén előfordulhat statisztikailag szignifikáns növekedés, a nagyfokú irritációval azonban ezt különösen nem hozták összefüggésbe (30) (31) (32) (33) (34).
24. Az integrált értékelés részeként alkalmazva a következő klinikai tünetek jelezhetnek szisztémás toxicitást (35), és ezáltal kijelölhetik a fő LLNA: DA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózist: az idegrendszer működésében bekövetkező változások (például piloerекció, ataxia, tremorok és görcsrohamok); a viselkedésben bekövetkező változások (például agresszivitás, a tisztálkodási tevékenységekben bekövetkező változás, az aktivitási szint jelentős változása); a légzési mintázat változása (például a légvételek gyakoriságában és az intenzitásában bekövetkező változás, úgymint dyspnoe, zihálás és szörtyzörejek), valamint változások az táplálék- és vízfogyasztásban. Továbbá az értékelés során figyelembe kell venni a letargia és/vagy reakciókészség hiányának jeleit, valamint az enyhénél és pillanatnyinál fokozottabb fájdalom vagy szenvedés bármilyen klinikai tünetét, az  $> 5$  %-nál nagyobb arányú testtömeg-csökkenést az 1. naptól a 8. napig tartó időszakban, valamint a mortalitást. Az elhullásközeli állapotban lévő vagy súlyos fájdalmak és szenvedés jeleit mutató állatokat humánus módon exterminálni kell (36).

**A fő vizsgálat kísérleti ütemterve**

25. A vizsgálat kísérleti ütemterve a következő:
- 1. nap: Külön meg kell határozni, és fel kell jegyezni mindegyik állat testtömegét és az esetleges klinikai megfigyeléseket. Vigyük fel 1 % nátrium-lauril-szulfát (SLS) vizes oldatát mindkét fül dorzális oldalára egy SLS-oldatba mártott kefével, és négy-öt húzással be kell fedni a fülek teljes dorzális felszínét. Az SLS-tal végzett kezelés után egy órával vigyük fel a vizsgált anyag megfelelő hígításából 25  $\mu$ l-t, valamint a vivőanyagot önmagában, illetve pozitív kontrollt (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11–15. bekezdésekben foglaltakat) a fülek dorzális oldalára.
  - 2., 3. és 7. nap: Az 1. napnak megfelelően ismételjük meg az SLS 1 %-os vizes oldatával végzett előkezelést, valamint a vizsgált anyag felviteli eljárását.
  - 4., 5. és 6. nap: Nincs kezelés.
  - 8. nap: Fel kell jegyezni minden állat testtömegét és minden klinikai megfigyelést. Az állatokat az alkalmazás megkezdése után körülbelül 24–30 órával a 7. napon humánus módon extermináljuk. Mindegyik egér füléből vágjuk ki a kezelt terület nyirokelvezetéséről gondoskodó füli nyirokcsomókat, és tegyük be azokat állatonként külön-külön foszfáttal puffertalt sóoldatba (PBS). A nyirokcsomók azonosításának és preparálásának részletei és az ehhez kapcsolódó ábrák az (22) hivatkozásban találhatóak. A helyi bőrreakció fő vizsgálatban történő további monitorozásához olyan további paramétereket lehet belevenni a vizsgálati protokollba, mint például a bőrpír pontozása vagy a fülvastagság mérése (akár vastagságmérővel, akár előlés utáni fülárbastülmeghatározással).

### A sejtuszuspenziók elkészítése

26. Mindegyik egér esetében el kell készíteni a két oldalról kimetszett nyirokcsomó-sejtek (LNC) különálló sejtekből álló szuszpenzióját; ehhez a nyirokcsomót két üveg tárgylemez közé kell helyezni, és a nyirokcsomók összetöréséhez enyhén nyomást kell rá gyakorolni. Miután meggyőződünk róla, hogy a szövet vékony rétegben szétterjedt, válasszuk szét a két tárgylemezt. Szuszpendáljuk a két tárgylemezen található szövetet PBS-ben; ehhez a tárgylemezeket Petri-csésze fölött ferdén tartva öblítsük le PBS-oldattal, eközben sejtkaparóval kaparjuk le a szövetet a tárgylemezről. A negatív kontrollként szolgáló állatok nyirokcsomói kisméretűek, ezért az SI-értékre gyakorolt mesterséges hatások elkerülése érdekében fontos az elővigyázatos kezelés. A két tárgylemez leöblítéséhez összesen 1 ml térfogatú PBS-oldatot kell használni. A Petri-csészében lévő LNC-szuszenziót a sejtkaparóval enyhén homogenizálni kell. Ezután az LNC-szuszenzióból mikropipettával 20 µl-nyi adagot fel kell szívni, ügyelve arra, hogy szemmel látható membránt ne szívjunk fel, majd el kell keverni 1,98 ml PBS-oldattal, hogy 2 ml-nyi mintát kapjunk. Ezután ugyanilyen eljárással újabb 2 ml-es mintát kell készíteni, hogy minden állat esetében két minta álljon rendelkezésre.

### A sejtprolifерáció meghatározása (a limfociták ATP-tartalmának mérése)

27. A nyirokcsomók ATP-tartalmában bekövetkezett növekedést a luciferin/luciferáz módszerrel ATP-mérési készlet segítségével határozzuk meg, amely a biolumineszcenciát relatív lumineszcencia egységekben (RLU) méri. A vizsgálat idejének az állat exterminálásától az ATP-tartalom méréséig mindegyik állat esetében azonosnak, körülbelül 30 percesnek kell lennie, ugyanis az ATP tartalom az állat exterminálása után idővel feltételezhetően fokozatosan csökken (12). Tehát az eljárások sorát az aurikuláris nyirokcsomók kimetszésétől az ATP méréséig, az előre meghatározott, mindegyik állat esetében azonos ütemterv szerint 20 percen belül el kell végezni. Az ATP-lumineszcenciát mindegyik 2 ml-es mintában mérni kell, hogy minden állat esetében összesen két ATP mérési eredmény álljon rendelkezésre. Ezután meghatározzuk az átlagos ATP-lumineszcenciát, és a további számításhoz ezt alkalmazzuk (lásd a 30. bekezdést).

### MEGFIGYELÉSEK

#### Klinikai megfigyelések

28. Naponta legalább egyszer minden egérnél meg kell vizsgálni az alkalmazás helyén kialakuló lokális vagy szisztémás toxicitás esetleges tüneteit. Minden megfigyelést szisztematikusan fel kell jegyezni minden egyes egér esetében, egyedi adatsor felvételével. A monitoring tervnek tartalmaznia kell azon kritériumokat, amelyek alapján azonnal azonosíthatóak az eutanáziát igénylő, szisztémás toxicitást, kiterjedt helyi bőrirritációt vagy bőrkorróziót mutató egerek (36).

### Testtömeg

29. Ahogyan az a 25. bekezdésben szerepel, az egyes állatok testtömegét a vizsgálat kezdetén, valamint a humánusan történő exterminálás tervezett időpontjában kell megmérni.

### AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

30. Az egyes kezelési csoportokra vonatkozó eredményeket átlagos stimulációs indexben (SI) fejezzük ki. Az SI kiszámítása úgy történik, hogy a vizsgált anyaggal kezelt egyes csoportokban és a pozitív kontrollcsoportban kapott állatonkénti átlagos RLU-értéket el kell osztani az oldószerez/vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport átlagos állatonkénti RLU-értékével. A vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportok átlagos SI-értéke tehát 1.
31. A válaszreakciót akkor lehet pozitívan értékelni, ha a stimulációs index  $\geq 1,8$  (10). Amikor azonban azt kell meghatározni, hogy egy határértéken lévő eredmény (vagyis amikor az SI-érték 1,8 és 2,5 között van) pozitívnek tekintendő-e, akkor a dózis-válasz összefüggés erőssége, a statisztikai szignifikancia és az oldószerez/vivőanyaggal, valamint a pozitív kontrollal kapott válaszreakciók következetessége is felhasználható (2) (3) (37).
32. Az 1,8 és 2,5 közötti SI-vel járó, határértéken lévő pozitív válaszreakciók esetében a felhasználók dönthetnek úgy, hogy az eredmények pozitívitásának megerősítéséhez további információkat – például a dózis-válasz összefüggést, szisztémás toxicitás vagy nagyfokú irritáció jelét, illetve adott esetben a statisztikai szignifikanciát az SI értékekkel együtt – kívánunk figyelembe venni (10). Figyelembe kell venni a vizsgált anyag különféle tulajdonságait is, köztük azt, hogy mutat-e szerkezeti rokonságot ismert bőrszenzibilizáló anyagokkal, okoz-e nagyfokú bőrirritációt egereknél, illetve a megfigyelt dózis-válasz összefüggés jellegét. Ezek, illetve további megfontolások részletesebb tárgyalását lásd a (4) hivatkozásban.
33. Az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtés lehetővé teszi a dózis-válasz összefüggés adatokban tükröződő fennállásának és mértékének statisztikai elemzését. Bármely statisztikai elemzés tartalmazhatja a dózis-válasz összefüggés értékelését, valamint a vizsgálati csoportok megfelelően korrigált összehasonlításait (például a dóziscsoportok páronkénti összehasonlítása a párhuzamos oldószerez/vivőanyagok kontrollcsoportokkal). A statisztikai elemzésekben a dózis-válasz tendenciák értékelésénél szerepelhet például lineáris regresszió vagy William-féle próba, a páronkénti összehasonlításoknál pedig Dunnett-féle próba. A megfelelő statisztikai elemzési módszer kiválasztásakor a vizsgálónak figyelemmel kell lennie a lehetséges varianciaegyenlőtlenségekre és más kapcsolódó problémákra, amelyek miatt az adatok transzformációjára vagy nem paraméteres statisztikai elemzésre lehet szükség. A vizsgálónak minden esetben el kell végeznie az SI-k kiszámítását és statisztikai elemzéseket bizonyos adatpontokkal (az úgynevezett »kiugró adatokkal») és azok nélkül.

## ADATOK ÉS JELENTÉS

**Adatok**

34. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, feltüntetve az egyedi állatok RLU-értékeit, a csoport átlagos RLU/állat értékét, a hozzá tartozó hibamutatóval (például SD, SEM), valamint az egyes dóziscsoportokban kapott átlagos stimulációs indexeket (SI) összehasonlítva a párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollcsoport értékeivel.

**Vizsgálati jelentés**

35. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

## Vizsgált anyagok és kontrollanyagok:

- azonosító adatok (pl. adott esetben a CAS-szám és az EU-szám; eredet; tisztaság; ismert szennyezők; tétel-szám),
- fizikai megjelenés és fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. illékonyság, stabilitás, oldhatóság),
- elegy esetén annak összetétele és az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya,

## Oldószer/vivőanyag:

- azonosító adatok (adott esetben tisztaság; koncentráció; alkalmazott térfogat),
- a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

## Kísérleti állatok:

- CBA egértörzs származása,
- az állatok mikrobiológiai státusa, amennyiben ismert,
- az állatok száma és életkora,
- az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.,

## Vizsgálati körülmények:

- az ATP készlet származása, tételszáma, a gyártó minőségbiztosítási/minőség-ellenőrzési adatai,
- a vizsgált anyagból előállított készítménnyel és annak alkalmazásával kapcsolatos adatok,
- a dózisszintek megválasztásának indoklása (ezen belül adott esetben az előszűrési vizsgálatok eredményei),
- a vivőanyag és a vizsgált anyag alkalmazott koncentrációja, valamint a vizsgált anyagból alkalmazott teljes mennyiség,
- a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete),
- a kezelés adatai és a mintavételek ütemezése,
- a toxicitás mérésére alkalmazott módszerek,
- a pozitív és negatív vizsgálati eredmény kimondásának kritériumai,
- a protokolltól való esetleges eltérések adatai, és annak kifejtése, hogy az eltérés hogyan érintheti vizsgálati tervet és az eredményeket,

## A megbízhatóság ellenőrzése:

- a legutóbbi megbízhatósági ellenőrzés eredményeinek összefoglalása az alkalmazott anyag, koncentráció és vivőanyag adataival együtt,

- a vizsgálólaboratórium párhuzamosan és/vagy korábban vizsgált pozitív és párhuzamosan vizsgált negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollokra vonatkozó adatai,
- ha nem vizsgáltak párhuzamosan pozitív kontrollt, a laboratóriumban legutóbb végzett időszakos pozitív kontroll dátuma és laboratóriumi jelentése, valamint pozitív kontroll vizsgálatának korábbi adatait részletező jelentés, amely indokolja, hogy miért nem végzik a laboratóriumban pozitív kontroll párhuzamos vizsgálatát,

#### Eredmények:

- az egyes állatok testtömege a kezelés kezdetén és az exterminálás tervezett időpontjában, illetve az átlagos és vonatkozó hibamutatók (pl. SD, SEM) kezelési csoportonként,
- a toxicitási tünetek, ezen belül az alkalmazás helyén esetleg kialakuló bőrirritáció megjelenésének időpontja és időbeli alakulása minden egyes állatra vonatkozóan,
- az állat exterminálásának időpontja és az ATP mérésének időpontja az egyes állatok esetében,
- az állatonkénti RLU-értékek és dóziscsoportonkénti SI-értékek táblázata,
- átlagos és kapcsolódó hibamutatók (pl. SD, SEM) az állatonkénti RLU-értékek esetében, az egyes kezelési csoportokban, és a kiugró értékek elemzése az egyes kezelési csoportokban,
- a kiszámított SI és a variabilitás megfelelő mutatója, amely az egyedek közti variabilitást a vizsgált anyaggal kezelt csoportban és a kontrollcsoportokban egyaránt figyelembe veszi,
- dózis-válasz összefüggés,
- adott esetben statisztikai elemzések,

#### Az eredmények tárgyalása:

- rövid kommentár az eredményekhez, a dózis-válasz elemzéshez és adott esetben a statisztikai elemzésekhez, és következtetés levonása arra vonatkozóan, hogy a vizsgált anyagot bőrszenzibilizáló hatásúnak kell-e tekinteni vagy sem.

#### SZAKIRODALOM

- (1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Elektronikus formátumban: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna/llnarep.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf)]
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.

- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 274-286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA:DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm>]
- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/LLNAPRPRept2009.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf)].
- (12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.
- (13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.
- (14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.
- (18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.
- (19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.
- (20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.
- (21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Elektronikus formátumban: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf)]
- (23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acetotox/Tox\\_workshop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acetotox/Tox_workshop.htm)]
- (36) 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 Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

### 1. függelék

#### FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

**Pontosság:** A vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az »egyezés« megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (38).

**Referenciaanyag:** A vizsgált anyaggal való összehasonlítás céljából etalonként használt szenzibilizáló vagy nem szenzibilizáló anyag. A referenciaanyaggal szemben a következő elvárások fogalmazhatók meg: i. állandó és megbízható beszerzési forrásból vagy forrásokból kell származnia; ii. a vizsgált anyagok csoportjához hasonló szerkezettel és funkcionalitással kell rendelkeznie; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állniuk az anyag ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v. a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

**Álnegatív eredmény:** Valamely vizsgálati módszerrel tévesen negatívnak vagy inaktívnak minősített anyag, amely valójában pozitív vagy aktív.

**Álpozítív:** Valamely vizsgálattal tévesen pozitívnek vagy aktívnek minősített anyag, amely valójában negatív vagy inaktív.

**Veszély:** Káros egészségügyi vagy ökológiai hatások előidézésének lehetősége. A káros hatás csak akkor jelenik meg, ha kellő szintű az expozíció.

**Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság:** Annak mértéke, hogy a különböző minősített laboratóriumok azonos protokoll és azonos vizsgált anyagok alkalmazásával mennyire képesek minőségileg és mennyiségileg azonos eredményeket produkálni. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság az előhitelesítési és hitelesítési folyamat során kerül meghatározásra, és annak mértékét jelzi, hogy az adott vizsgálat mennyire sikeresen vihető át laboratóriumok között; más néven laboratóriumok közötti megismételhetőség (38).

**Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság:** Annak meghatározása, hogy az ugyanazon laboratóriumban dolgozó képzett személyek meghatározott protokoll különböző időpontokban történő alkalmazásával mennyire sikeresen tudják reprodukálni az eredményeket. Más néven laboratóriumon belüli megismételhetőség (38).

**Kiugró érték:** A kiugró érték olyan megfigyelés, amely szembetűnően eltér az egy populációból vett véletlenszerű minta egyéb értékeitől.

**Minőségbiztosítás:** Irányítási folyamat, amelynek során a laboratóriumi vizsgálati szabványok és követelmények betartását, a jegyzőkönyvek vezetését, valamint az adattovábbítás pontosságát a vizsgálatot végző személyektől független személyek ellenőrzik.

**Megbízhatóság:** Azonos protokoll szerint végzett vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóságának mérésére szolgál. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (38).

**Bőrszenzibilizáció:** Immunológiai folyamat, amely akkor jelentkezik, ha egy érzékeny egyén lokálisan érintkezik valamely indukáló hatású allergén vegyi anyaggal, amely esetlegesen kontakt szenzibilizáció kialakulásához vezető immunválaszt vált ki a bőrben.

**Stimulációs index (SI):** Adott vizsgált anyag bőrszenzibilizációt okozó képességének meghatározására kiszámított érték, amely az anyaggal kezelt csoportban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportban tapasztalt proliferáció aránya.

**Vizsgált anyag (más néven vizsgált vegyi anyag):** Bármely anyag vagy keverék, amelyet ezzel a vizsgálati módszerrel vizsgálnak.

## **B.51. BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER (LLNA): BRDU-ELISA BEVEZETÉS**

1. Az OECD vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozó iránymutatásait és az uniós vizsgálati módszereket időnként felülvizsgálják a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és állatjóléti megfontolások fényében. A bőrszenzibilizáció egereknél történő meghatározására szolgáló első vizsgálati módszer (B.42.), a lokális nyirokcsomó-vizsgálat (LLNA; az OECD 429. vizsgálati iránymutatása) átdolgozásra került (e melléklet 1. és B.42. fejezete). Az LLNA hitelesítésének részleteit és az ezzel kapcsolatos munka áttekintését publikálták (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Az LLNA során a limfociták proliferációjának mérése radioizotópos timidin vagy jódd alkalmazásával történik, ezért amennyiben a radioaktív anyagok beszerzése, használata vagy ártalmatlanítása problémát jelent, a vizsgálat csak korlátozottan alkalmazható. Az LLNA: BrdU-ELISA (enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat) az LLNA vizsgálati módszer nem radioaktív változata, amely radioaktívan nem jelölt 5-bromo-2-dezoxiuridin (BrdU) (Chemical Abstracts Service [CAS] szám: 59-14-3) felhasználásával, ELISA alapú vizsgálati rendszerben méri a limfocitaproliferációt. Az LLNA: BrdU-ELISA-t vizsgálati módszert egy szakértőkből álló független nemzetközi értékelő testület hitelesítette, vizsgálta felül és ajánlotta olyan módszerként, amely a bőrszenzibilizációt okozó, illetve nem okozó vegyi anyagok meghatározására bizonyos megkötésekkel hasznosnak tekinthető (10) (11) (12). A vizsgálati módszer célja a vegyi anyagok (anyagok és keverékek) bőrszenzibilizáló hatásának állatoknál történő felmérése. E melléklet B.6. fejezete és az OECD 406. vizsgálati iránymutatása tengerimalac-vizsgálatokat alkalmaz, nevezetesen a tengerimalac-maximizációs módszert és Bühler-vizsgálatot (13). Az LLNA (e melléklet B.42. fejezete; az OECD 429. vizsgálati iránymutatása) és a két nem radioaktív módosított eljárás, az LLNA: BrdU-ELISA (e melléklet B.51. fejezete; az OECD 442. B. vizsgálati iránymutatása) és az LLNA: DA (e melléklet B.50. fejezete; az OECD 442. A. vizsgálati iránymutatása) egyaránt előnyösebb a B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában (13) szereplő tengerimalac-vizsgálatnál abból a szempontból, hogy kevesebb állat használatát igényli és kíméletesebben.

2. Az LLNA-hoz hasonlóan az LLNA: BrdU-ELISA vizsgálat is a bőrszenzibilizáció indukciós fázisát vizsgálja, és a dózis-válasz értékelésére alkalmas mennyiségi adatokat szolgáltat. Emellett azért, hogy a bőrszenzibilizáló anyagokat a DNS radioaktív jelölése nélkül lehet kimutatni, a munka során kiküszöbölhető a radioaktivitásnak való kitettség, valamint a hulladék ártalmatlanításának problémája. Ez viszont az egerek nagyobb arányú használatát jelentheti a bőrszenzibilizáló anyagok kimutatására, ami a bőrszenzibilizáló képesség vizsgálata során tovább csökkenthetné a tengerimalacok használatát (pl. B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati irányelve) (13).

#### FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

3. Az alkalmazott fogalmak meghatározása az 1. függelékben található.

#### KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. Az LLNA: BrdU-ELISA egy módosított LLNA (helyi nyirokcsomó-vizsgálati) módszer, amely bizonyos korlátozások mellett a bőrön túlérzékenységi reakciót kiváltó vegyi anyagok azonosítására szolgál. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy az LLNA vagy a tengerimalac-vizsgálat (lásd B.6. fejezet, az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (13) helyett minden esetben az LLNA: BrdU-ELISA-t kell alkalmazni, inkább azt, hogy ez a vizsgálati módszer ugyanolyan hasznos, és olyan alternatív módszerként alkalmazható, amely esetében a pozitív és negatív eredmények általában már nem igényelnek további megerősítést (10) (11). A vizsgálat elvégzése előtt a vizsgálati laboratóriumnak a vizsgált anyagról rendelkezésre álló összes adatot figyelembe kell vennie. Ezen információk közé tartozik a vizsgált anyag azonosítása, kémiai szerkezete, fizikai-kémiai tulajdonságai, valamint a vizsgált anyaggal korábban végzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei és a szerkezeti rokon vegyi anyagok toxikológiai adatai is. Mindezen információk figyelembevételével dönthető el, hogy az LLNA: BrdU-ELISA módszer alkalmazható-e a vizsgált anyag esetében (tekintve, hogy bizonyos vegyianyag-típusoknál inkompatibilitás áll fenn [lásd az 5. bekezdést]), és milyen dózist célszerű választani a vizsgálatokhoz.
5. Az LLNA: BrdU-ELISA *in vivo* módszer, következésképpen nem küszöbölhető ki vele az állatok felhasználása az allergiás kontakt szenzibilizáló hatás vizsgálata során. Ugyanakkor a tengerimalac-vizsgálatokhoz képest (B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) lehetővé teszi az állatok ilyen célú felhasználásának csökkentését (13). Továbbá az állatok kontakt szenzibilizációs vizsgálatok során történő felhasználásának módját tekintve az LLNA: BrdU-ELISA jelentősen kíméletesebb, mivel a B.6. fejezetben és a 406-os OECD vizsgálati irányelvben foglaltakkal ellentétben az LLNA: BrdU-ELISA esetében nincs szükség indukált bőr-hiperszenzitivitási reakciók előidézésére. Továbbá az LLNA: BrdU-ELISA során a tengerimalac-maximizációs vizsgálatokkal ellentétben nincs szükség adjuváns alkalmazására sem (e melléklet B.6. fejezete, 13). Az LLNA: BrdU-ELISA alkalmazásával tehát csökkenthető az állatok szenvedése. A B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában (13) foglalt módszerrel szembeni előnyei ellenére az LLNA: BrdU-ELISA módszernek vannak bizonyos korlátai, amelyek szükségessé tehetik a B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában foglalt alkalmazását (pl. bizonyos fémek vizsgálata, álpozitív eredmények bizonyos bőrirritáló anyagokkal [például bizonyos felületaktív anyagokkal]) (6) [1, illetve e melléklet B.42. fejezete], vagy a vizsgált anyag oldhatósága). Továbbá az olyan funkcionális csoportokat tartalmazó anyagcsoportok, illetve anyagok, amelyek potenciális zavaró tényezőként szerepelnek (15) szükségessé tehetik a tengerimalac-vizsgálatok (vagyis a B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása (13)) használatát. Az LLNA esetében megállapított korlátozásokat (1, illetve e melléklet B.42. fejezete) az LLNA: BrdU-ELISA módszerre is javasolt alkalmazni (10). E meghatározott hiányosságokon kívül, az LLNA: BrdU-ELISA bármilyen vegyi anyag vizsgálatára megfelelő, kivéve, ha ezek a vegyi anyagok olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek befolyásolják az LLNA: BrdU-ELISA pontosságát. Emellett abban az esetben, ha a stimulációs indexre (SI) kapott érték 1,6 és 1,9 közé esik (lásd a 31–32. bekezdést) figyelembe kell venni a határértéken lévő pozitív eredmények lehetőségét. Ez egy legalább 1,6 értékű stimulációs indexszel rendelkező, 43 anyagot magában foglaló hitelesítési adatbázison alapul (lásd a 6. bekezdést), a mely esetében az LLNA: BrdU-ELISA módszer helyesen azonosította mind a 32, az LLNA módszer szerint szenzibilizáló anyagot, de hibásan azonosított két anyagot az LLNA módszerrel nem szenzibilizálóként meghatározott, 1,6 és 1,9 közötti SI-értékkel (vagyis határértéken lévő pozitív értékkel) rendelkező 11 anyag közül (10). Mivel azonban az SI-értékek beállításához és a vizsgálat prediktív jellemzőinek kiszámításához ugyanazt az adatállományt alkalmazták, a megadott eredmények túlbecsülhetik a valós prediktív jellemzőket.

#### A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

6. Az LLNA: BrdU-ELISA módszer hátterében az az alapelv áll, hogy a szenzibilizáló anyagok elsődleges limfocita-proliferációt indukálnak a vizsgált anyag alkalmazási területének nyirokvezetéséről gondoskodó nyirokcsomókban. Ez a proliferáció arányos az alkalmazott allergén dóziséval és erősségével, valamint egyszerű módszert biztosít a szenzibilizáció kvantitatív méréséhez. A proliferációt úgy mérik, hogy az egyes vizsgálati csoportokban mért átlagos proliferációt összehasonlítják a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportban (VK) mért átlagos proliferációval. Meghatározzák az egyes kezelt csoportokban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokban mért átlagos proliferáció arányát, amelyet stimulációs indexnek (SI) neveznek, és amelynek legalább  $\geq 1,6$ -nek kell lennie ahhoz, hogy indokolt legyen a vizsgált anyag potenciális bőrszenzibilizáló anyagként történő további vizsgálata. Az itt leírt eljárások a BrdU tartalom mérésén alapulnak, amely jelzi az elvezető aurikuláris nyirokcsomókban lévő proliferáló sejtek számának növekedését. A BrdU egy timidinanalóg, amely hasonlóan beépül a proliferáló sejtek DNS-ébe. A BrdU beépülését ELISA-val mérjük, amely peroxidázzal is jelölt BrdU-specifikus antitestet alkalmaz. A szubsztrát hozzáadásakor a peroxidáz reakcióba lép a szubsztráttal, és színes termék képződik, amelynek mennyisége meghatározott abszorbancia mellett mikrotiterlemez-leolvasó segítségével mérhető.

## A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

### Az állatfaj kiválasztása

7. Ehhez a vizsgálathoz az egér a választandó faj. A LLNA: BrdU-ELISA módszerhez a hitelesítési vizsgálatokat kizárólag a CBA/JN törzssel végezték, amely ezért preferált törzsnak tekintendő (10) (12). Fialat felnőtt nullipara és nem vemhes nőstény egereket kell használni. A vizsgálat elején az állatok korának 8-12 hétnek kell lennie, az állatok testtömege között az eltérésnek minimálisnak kell lennie, és a testtömeg nem haladhatja meg az átlagos testtömeg 20 %-át. Ha elegendő adat áll rendelkezésre arra nézve, hogy az LLNA: BrdU-ELISA módszerrel kapott válaszreakcióban nincsenek jelentős törzs- és/vagy ivarspecifikus különbségek, akkor más törzsek, illetve hím állatok is alkalmazhatók.

### Az állatok tartásának és etetésének körülményei

8. Az egereket csoportosan kell tartani (16), kivéve, ha az egyedenkénti tartásra megfelelő tudományos indok merül fel. A kísérleti állatok tartásául szolgáló helyiség hőmérsékletének  $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ -nak kell lennie. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem haladhatja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos, 12 órás sötét periódusok váltakozásával. Az etetéshez a szokásos laboratóriumi takarmány alkalmazható korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

### Az állatok előkészítése

9. Az állatokat véletlenszerűen választják ki, majd egyedi azonosítóval látják el (viszont az állat fülén semmiféle azonosító nem alkalmazható), és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben tartják őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez. A kezelés megkezdése előtt minden állatot megvizsgálunk, hogy meggyőződjünk arról, nincs rajtuk látható bőrsérülés.

### A dózisok előkészítése

10. A szilárd halmazállapotú vegyi anyagokat az egér fülén történő alkalmazás előtt oldószerben/vivőanyagban kell feloldani vagy szuszpendálni, és szükség esetén hígítani kell. A folyadék halmazállapotú vegyi anyagokat hígítatlanul vagy az adagolás előtt hígított formában lehet alkalmazni. A nem oldható vegyi anyagokat, például az orvosi eszközökben általánosan előforduló anyagokat megfelelő oldószerben történő agresszív extrakciónak kell kitenni, hogy a vizsgálat során az egér fülén való alkalmazás előtt az összes kivonható összetevőt feltárjuk. A vizsgált anyagokat naponta kell elkészíteni, kivéve, ha stabilitási adatok igazolják, hogy a tárolás elfogadható.

### A megbízhatóság ellenőrzése

11. A vizsgálat megfelelő teljesítményének megfelelő és reprodukálható szenzitivitással adott válaszreakciókkal történő igazolására pozitív kontrollanyagokat (PK) alkalmaznak; ezek olyan szenzibilizáló tesztanyagok, amelyek esetében a válaszreakció mértéke pontosan meghatározott. Pozitív kontroll párhuzamos vizsgálata ajánlott, mivel ez igazolja, hogy a laboratórium megfelelő szakértelemmel végzi az egyes vizsgálatokat, és lehetővé teszi a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság és összehasonlíthatóság értékelését. Néhány szabályozó hatóság szintén előírja a pozitív kontroll minden vizsgálat során történő alkalmazását, ezért az LLNA: BrdU-ELISA módszer elvégzése előtt ajánlott egyeztetni az illetékes hatóságokkal. Ennek megfelelően javasolt a pozitív kontroll rutinszerű párhuzamos vizsgálata, hogy elkerülhetőek legyenek az olyan további állatkísérletek, amelyeket a pozitív kontrollt csak időszakszerűen alkalmazó laboratórium az előírásoknak való megfelelés érdekében végezne (lásd 12. bekezdés). A pozitív kontrollnak az LLNA: BrdU-ELISA módszerrel olyan expozíciós szint mellett kell pozitív válaszreakciót adnia, amely a negatív kontrollcsoporthoz (NK) képest várhatóan legalább 1,6-dal növeli a stimulációs indexet (SI). A pozitív kontroll dózist úgy kell megválasztani, hogy ne okozzon túlzott bőrirritációt vagy szisztémás toxicitást, és az indukció reprodukálható, de ne túl nagymértékű legyen (például  $SI > 14$  már túlzottnak tekinthető). Az előnyben részesítendő pozitív kontrollanyagok a 25 %-os hexil-cinnemaldehid (CAS-szám: 101-86-0) és a 25 %-os eugenol (CAS-szám: 97-53-0) aceton:olívoalaj (4:1, v/v) arányú keverékében. Adódhatnak olyan körülmények, amelyek fennállásakor, megfelelő indoklás esetén a fenti kritériumoknak megfelelő más pozitív kontrollanyagok is alkalmazhatók.
12. Bár ajánlott a pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata, lehetnek azonban olyan helyzetek, amikor a pozitív kontroll időszakot (például legalább 6 havonta végzett) vizsgálata elfogadható lehet az olyan, az LLNA: BrdU-ELISA vizsgálatot rendszeresen (vagyis legalább havonta egyszeri gyakorisággal) végző laboratóriumok esetében, amelyek rendelkeznek a pozitív kontrollok igazolt, historikus adatbázisával, és ezzel bizonyítható, hogy a laboratórium a pozitív kontrollokkal képes reprodukálható és pontos eredményeket előállítani. Az LLNA: BrdU-ELISA módszerben való jártasság alátámasztható a pozitív kontrollal megfelelő időszakon belül (kevesebb mint egy éve) végzett legalább 10 független vizsgálat során kapott következetesen pozitív eredményekkel.
13. Pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata minden alkalommal szükséges, valahányszor az LLNA: BrdU-ELISA vizsgálati módszerében változtatást hajtanak végre (például a képzett személyzet, a vizsgálati eljárás során használt anyagok és/vagy reagensek, a vizsgálati eszközök, a kísérleti állatok beszerzési forrásának megváltoztatása), és ezeket a változásokat dokumentálni kell a laboratóriumi jelentésekben. Figyelembe kell venni, hogy ezek a változtatások mennyiben befolyásolják a korábban létrehozott historikus adatbázis megfelelőségét, és el kell dönteni, hogy szükséges-e új historikus adatbázis felállítását a pozitív kontroll eredményei következetességének dokumentálása érdekében.

14. A vizsgálatot végző személyeknek tisztában kell lenniük azzal, hogy amennyiben a párhuzamos vizsgálat helyett a pozitív kontrollok időszakos vizsgálata mellett döntenek, ez hatással lehet a pozitív kontrollok időszakos vizsgálata közötti időszakokban, párhuzamos pozitív kontroll vizsgálata nélkül előállított negatív vizsgálati eredmények megfelelésére és elfogadhatóságára. Ha például a pozitív kontrollal végzett időszakos vizsgálat álnegatív eredményt adott, akkor megkérdőjelezhető az a negatív eredmények, amelyek az utolsó elfogadható eredményű és az elfogadhatatlan eredményű időszakos pozitív kontroll vizsgálat között eltelt időszakban keletkeztek. Az ilyen következmények jelentőségét körültekintően mérlegelni kell annak eldöntésekor, hogy pozitív kontrollokat párhuzamosan vagy csak időszakosan vizsgáljanak-e. Szintén megfontolandó a kevesebb állat használata a párhuzamos pozitív kontrollcsoportban, amennyiben ez tudományosan indokolt, és a laboratóriumra specifikus historikus adatok alapján a laboratórium igazolja, hogy megfelelő a kevesebb egér használata (17).
15. Bár a pozitív kontrollt olyan vivőanyagban kell vizsgálni, amelyről ismert, hogy következetes válaszreakciót vált ki (például aceton:olívajolaj; 4:1, v/v arányú keveréke), lehetnek olyan szabályozási helyzetek, amikor nem szokványos vivőanyagokban (klinikailag/kémiaiilag releváns készítmény) történő vizsgálat elvégzésére is szükség van (18). Amennyiben a párhuzamos pozitív kontrollt a vizsgált anyagétól eltérő vivőanyagban vizsgálják, akkor a párhuzamos pozitív kontrollal együtt egy külön vivőanyagot is vizsgálni kell.
16. Azokban az esetekben, amikor egy bizonyos vegyi csoportba tartozó vizsgált anyagokat vagy a válaszreakciók tartományát értékelik, szintén hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása annak igazolására, hogy a vizsgálati módszer megfelelően működik az ilyen típusú vizsgált anyagok bőrszenzibilizáló hatásának kimutatására. A megfelelő referenciaanyagoknak a következő tulajdonságokkal kell rendelkezniük:
- szerkezeti és funkcionális hasonlóság a vizsgált anyag csoportjával,
  - ismert fizikai/kémiai tulajdonságok,
  - az LLNA: BrdU-ELISA módszerrel kapott alátámasztó adatok,
  - egyéb állatmodellekből és/vagy emberből származó alátámasztó adatok.

#### VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

##### Az állatok száma és a dózisszintek

17. Minden dóziscsoportban legalább négy állatot kell használni, és a vizsgált anyagból legalább három különböző koncentrációt, továbbá párhuzamos negatív kontrollcsoportot, amelyet csak a vizsgált anyaghoz használt vivőanyaggal kezelnek, valamint egy pozitív kontroll csoportot kell alkalmazni (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11–15. bekezdésben foglaltakat). Megfontolandó a pozitív kontroll többféle dózisának vizsgálata, különösen, ha a pozitív kontroll vizsgálatát időszakosan végzik. A kontrollcsoportban lévő állatokkal ugyanúgy kell bánni és dolgozni, mint a kezelt csoportokban lévőkkel, azzal a kivétellel, hogy az állatokat nem kezelik a vizsgált anyaggal.
18. A dózist és a vivőanyagot a 2. és 19. számú hivatkozásokban megadott ajánlások alapján kell kiválasztani. Az egymás utáni dózisos kiválasztása általában megfelelő koncentrációsorból, például 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % stb. történik. Az alkalmazott koncentrációsor megfelelő tudományos megfontolások alapján kell kiválasztani. A három egymás utáni koncentráció kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált anyagról esetlegesen rendelkezésre álló valamennyi toxikológiai információt (például akut toxicitás és bőrirritáció), valamint szerkezeti és fizikokémiai adatot, hogy a legmagasabb koncentrációval a lehető legnagyobb expozíciót idézzük elő, amely még nem okoz szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű lokális bőrirritációt (19) (20, illetve e melléklet B.4. fejezete). Ilyen jellegű információk hiányában szükséges lehet a megelőző előszűrő vizsgálat (lásd a 21–24. bekezdést).
19. A vivőanyagoknak nem szabad megzavarnia vagy befolyásolnia a vizsgálat eredményét, és aszerint kell kiválasztani, hogy a vizsgált anyag oldhatósága a lehető legnagyobb koncentráció elérése érdekében maximális legyen, ugyanakkor a vizsgált anyag felvitelére alkalmas oldatot/szuszenziót kapjunk. A javasolt vivőanyagok az aceton:olívajolaj (4:1 v/v) keveréke, N,N-dimetilformamid, metil-etil-keton, propilén-glikol és dimetil-szulfid (6), de megfelelő tudományos indoklás esetén más vivőanyagok is alkalmazhatók. Bizonyos esetekben további kontrollként szükséges lehet valamely klinikai szempontból releváns oldószer használata, vagy annak a kereskedelmi formulának az alkalmazása, amelyben a vizsgált anyagot forgalomba hozzák. Különösen vigyázni kell arra, hogy megfelelő szolubilizáló szerek (pl. 1 % Pluronic® L92) alkalmazásával a hidrofíl vizsgált anyagokat olyan vivőanyagrendszerbe építsük be, amely benedvesíti a bőrt, de nem folyik le azonnal. A teljesen vizes alapú vivőanyagokat tehát kerülni kell.
20. A nyirokcsomók egyedenként történő feldolgozása lehetővé teszi az egyedek közötti variabilitás, valamint a vizsgált anyaggal és a vivőanyaggal kezelt csoport eredményeinek statisztikai összehasonlítását (lásd a 33. bekezdést). Emellett csak akkor lehet értékelni, hogy lehetséges-e csökkenteni a pozitív kontrollcsoportban lévő egerek számát, ha az egyedi állatokra vonatkozóan gyűjtünk adatokat (17). Ezen túlmenően, egyes szabályozó hatóságok is megkövetelik az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtést. Az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtés rendszeresítése állatjóléti előnyökkel jár azért, hogy elkerülhető a vizsgálatok megismétlése abban az esetben, amikor a vizsgált anyagról eredetileg csak egyféleképpen gyűjtötték az adatokat (pl. összevont állatkísérletes adatok), míg a szabályozó hatóság később eltérő követelményeket állít fel (pl. egyedi állatokon alapuló adatok).

**Előszűrő vizsgálat**

21. A legmagasabb vizsgálandó dózis meghatározását lehetővé tevő információ hiányában (lásd a 18. bekezdést) az LLNA: BrdU-ELISA módszerhez alkalmazandó megfelelő dózisszint megállapítása érdekében előszűrő vizsgálatot kell végezni. Az előszűrő vizsgálat célja, hogy támpontot adjon az LLNA: BrdU-ELISA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózis kiválasztásához, amennyiben a szisztémás toxicitást (lásd a 24. bekezdést) és/vagy nagyfokú bőrirritációt (lásd a 23. bekezdést) okozó koncentrációra vonatkozó információk nem állnak rendelkezésre. Folyadékok esetében a legmagasabb vizsgált dózissnak 100 %-os koncentrációnak kell lennie, szilárd anyagok vagy szuszpenziók esetében pedig a lehetséges maximális koncentrációnak.
22. Az előszűrő vizsgálatot a fő LLNA: BrdU-ELISA vizsgálatához hasonló körülmények között kell végezni, eltekintve attól, hogy nem kell a nyirokcsomó-proliferációt értékelni, valamint dóziscsoportonként kevesebb állat használható. Dóziscsoportonként egy vagy két állat javasolt. Az egereket a szisztémás toxicitás, illetve az alkalmazás helyén fellépő helyi irritáció jeleinek szempontjából naponta megfigyelik. A testtömeget a vizsgálat előtt és az állat exterminálása előtt is (6. nap) feljegyzik. A bőrpírt az egerek mindkét fülén vizsgálják és pontozzák az 1. táblázat (20, illetve e melléklet B.4. fejezete) szerint. A fülvastagság értékeit egy vastagságmérővel (például digitális mikrométer, vagy Peacock Dial vastagságmérő) állapítják meg az 1. napon (az adagolás előtt), a 3. napon (hozzávetőleg 48 órával az első dózis után), valamint a 6. napon. A 6. napon a fülvastagságot ezen kívül a fülből lyukasztással eltávolított szövet tömegének meghatározásával is meg lehet állapítani, amit az állat exterminálása után kell elvégezni. Nagyfokú helyi irritációnak minősül a legalább  $\geq 3$ -as pontszámú bőrpír és/vagy legalább  $\geq 25$  %-os fülvastagság a vizsgálat bármely napján (21) (22). A fő LLNA: BrdU-ELISA vizsgálatához azt a dózist kell maximális dózisként választani, amely az előszűrés során alkalmazott koncentráció sorban (lásd a 18. bekezdést) a szisztémás toxicitást és/vagy nagyfokú helyi bőrirritációt okozó koncentrációnál eggyel alacsonyabb.

## 1. táblázat

**Bőrpír (erythema) pontszámai**

Megfigyelés	Pontszám
Nincs erythema	0
Nagyon enyhe erythema (alig észlelhető)	1
Jól körülírt erythema	2
Közepes-súlyos erythema	3
Súlyos (céklavörös elszíneződés), pörkképződéig terjedő erythema, amely lehetetlenné teszi az erythema besorolását	4

23. A 25 %-os fülvastagság-növekedésen felül (21) (22), a bőrirritáló anyagok LLNA módszerrel végzett kimutatásához a kezelt állatok fülvastagságának kontrollcsoporthoz viszonyított statisztikailag szignifikáns növekedését is használják (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Noha 25 % alatti fülvastagság esetén előfordulhat statisztikailag szignifikáns növekedés, a nagyfokú irritációval azonban ezt különösen nem hozták összefüggésbe (25) (26) (27) (28) (29).
24. Az integrált értékelés részeként alkalmazva a következő klinikai tünetek jelezhetnek szisztémás toxicitást (30), és ezáltal kijelölhetik a fő LLNA: BrdU-ELISA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózist: az idegrendszer működésében bekövetkező változások (például piloerekción, ataxia, tremorok és görcsrohamok); a viselkedésben bekövetkező változások (például agresszivitás, a tisztálkodási tevékenységekben bekövetkező változás, az aktivitási szint jelentős változása); a légzési mintázat változása (például a légvételek gyakoriságában és az intenzitásában bekövetkező változás, úgymint dyspnoe, zihálás és szörtyözörek), valamint változások az táplálék- és vízfogyasztásban. Az értékelés során emellett figyelembe kell venni a letargia és/vagy reakciókészség hiányának jeleit, valamint az enyhénél és pillanatnyinál fokozottabb fájdalom vagy szenvedés bármilyen klinikai tünetét, az > 5 %-nál nagyobb arányú testtömegcsökkenést az 1. naptól a 6. napig tartó időszakban, valamint a mortalitást. Az elhullásközeli állapotban lévő vagy súlyos fájdalmak és szenvedés jeleit mutató állatokat humánus módon exterminálni kell (31).

**A fő vizsgálat kísérleti ütemterve**

25. A vizsgálat kísérleti ütemterve a következő:

- 1. nap: Külön meg kell határozni, és fel kell jegyezni mindegyik állat testtömegét és az esetleges klinikai megfigyeléseket. Vigyünk fel 25  $\mu$ l térfogatú, megfelelő hígítású vizsgált anyagot, valamint a vívőanyagot önmagában vagy pozitív kontrollt (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11–15. bekezdésekben foglaltakat) a fülek dorzális oldalára.
- 2. és 3. nap: Ismételjük meg az 1. napon elvégzett felvételi eljárást.
- 4. nap: Nincs kezelés.
- 5. nap: Fecskendezzünk be 0,5 mL (5 mg/egér) BrdU (10 mg/ml) oldatot intraperitoneálisan.

- 6. nap: Fel kell jegyezni minden állat testtömegét és minden klinikai megfigyelést. A BrdU befecskendezése után körülbelül 24 órával (24 h) extermináljuk az állatokat. Mindegyik egér füléből vágjuk ki a kezelt terület nyirokvezetéséről gondoskodó füli nyirokcsomókat, és tegyük be azokat állatonként külön-külön foszfáttal pufferelt sóoldatba (PBS). A nyirokcsomók azonosításának és preparálásának részletei és az ehhez kapcsolódó ábrák a (17) hivatkozásban találhatóak. A helyi bőrreakció fő vizsgálatban történő további monitorozásához olyan további paramétereket lehet belevenni a vizsgálati protokollba, mint például a bőrpír pontozása vagy a fülvastagság mérése (akár vastagságmérővel, akár előlés utáni fülдарabsúly-meghatározással).

#### A sejtszuspenziók elkészítése

26. Az egyes állatokból két oldalról vett nyirokcsomósejtekből (LNC) egysejtszuspenziót kell készíteni a sejtek mechanikus úton történő óvatos szétválasztásával, amely végezhető 200 mikrométeres lyukméretű rozsdamentes acélból készült fémhálóval vagy egyéb elfogadható módszerrel (pl. a nyirokcsomók egyszer használatos műanyag mozsárban történő összetörése, majd 70-es nejlonhálón való átréselése). Az LNC szuspenzió elkészítése a vizsgálat szempontjából döntő fontosságú, ezért a módszert a vizsgálatot végző valamennyi munkatársnak előre el kell sajátítani. A negatív kontrollként szolgáló állatok nyirokcsomói kisméretűek, ezért az SI-értékre gyakorolt mesterséges hatások elkerülése érdekében fontos az elővigyázatos kezelés. Az LNC szuspenzió céltér-fogatát minden esetben a meghatározott optimalizált térfogathoz kell igazítani (körülbelül 15 ml). Az optimális térfogat meghatározása a negatív kontrollcsoport 0,1–0,2 közötti átlagos abszorbanciájának elérésén alapul.

#### A sejtproliferáció meghatározása (a BrdU limfociták DNS-ébe való beépülésének mérése)

27. A BrdU mérése a kereskedelemben kapható ELISA készlet (például Roche Applied Science, Mannheim, Németország, katalógusszám: 11 647 229 001) használatával történik. A mérés lényege, hogy az LNC-szuspenziókból három adagban 100 µl-t kell egy lapos aljú mikrotiterlemez mélyedéseibe adagolni. Az LNC fixálása és denaturálása után mindegyik mélyedésbe anti-BrdU-antitestet kell adni, majd várni kell, hogy a reakció kialakuljon. Ezután az anti-BrdU antitestet mosással el kell távolítani, majd hozzá kell adni a szubsztrátoldatot, és várni kell, hogy kialakuljon a kromogén termék. Ekkor 370 nm-en 492 nm-es referencia-hullámhossz mellett mérni kell az abszorbanciát. A vizsgálati körülményeket minden esetben optimalizálni kell (lásd a 26. bekezdést).

#### MEGFIGYELÉSEK

##### Klinikai megfigyelések

28. Naponta legalább egyszer minden egernél meg kell vizsgálni az alkalmazás helyén kialakuló lokális vagy szisztémás toxicitás esetleges tüneteit. Minden megfigyelést szisztematikusan fel kell jegyezni minden egyes egér esetében, egyedi adatsor felvételével. A monitoring tervnek tartalmaznia kell azon kritériumokat, amelyek alapján azonnal azonosíthatóak az eutanáziát igénylő, szisztémás toxicitást, kiterjedt helyi bőrirritációt vagy bőrkorróziót mutató egerek (31).

#### Testtömeg

29. Ahogyan az a 25. bekezdésben szerepel, az egyes állatok testtömegét a vizsgálat kezdetén, valamint a humánusan történő exterminálás tervezett időpontjában kell megmérni.

#### AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

30. Az egyes kezelési csoportokra vonatkozó eredményeket átlagos stimulációs indexben (SI) fejezzük ki. Az SI kiszámítása úgy történik, hogy a vizsgált anyaggal kezelt egyes csoportokban és a pozitív kontrollcsoportban kapott állatonkénti átlagos BrdU jelölési indexet el kell osztani az oldószerrel/vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport átlagos BrdU jelölési indexével. A vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportok átlagos SI-értéke tehát 1.

A BrdU jelölési index meghatározása:

$$\text{BrdU jelölési index} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS}_{\text{vak}_{\text{em}}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS}_{\text{vak}_{\text{ref}}})$$

em = kibocsátott hullámhossz; ref = referencia hullámhossz.

31. A válaszreakciót akkor lehet pozitívan értékelni, ha a stimulációs index  $\geq 1,6$  (10). Amikor azonban azt kell meghatározni, hogy egy határértéken lévő eredmény (vagyis amikor az SI-érték 1,6 és 1,9 között van) pozitívnek tekintendő-e, akkor a dózis-válasz összefüggés erőssége, a statisztikai szignifikancia és az oldószerrel/vivőanyaggal, valamint a pozitív kontrollal kapott válaszreakciók következetessége is felhasználható (3) (6) (32).
32. Az 1,6 és 1,9 közötti SI-vel járó, határértéken lévő pozitív válaszreakciók esetében a felhasználók dönthetnek úgy, hogy az eredmények pozitivitásának megerősítéséhez további információkat – például a dózis-válasz összefüggést, szisztémás toxicitás vagy nagyfokú irritáció jelét, illetve adott esetben a statisztikai szignifikanciát az SI értékekkel együtt – kívánnak figyelembe venni (10). Figyelembe kell venni a vizsgált anyag különféle tulajdonságait is, köztük azt, hogy mutat-e szerkezeti rokonságot ismert bőrszenzibilizáló anyagokkal, okoz-e nagyfokú bőrirritációt egereknél, illetve a megfigyelt dózis-válasz összefüggés jellegét. Ezek, illetve további megfontolások részletesebb tárgyalását lásd a (4) hivatkozásban.

33. Az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtés lehetővé teszi a dózis-válasz összefüggés adatokban tükröződő fennállásának és mértékének statisztikai elemzését. Bármely statisztikai elemzés tartalmazhatja a dózis-válasz összefüggés értékelését, valamint a vizsgálati csoportok megfelelően korrigált összehasonlításait (például a dóziscsoportok páronkénti összehasonlítása a párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollcsoportokkal). A statisztikai elemzésekben a dózis-válasz tendenciák értékelésénél szerepelhet például lineáris regresszió vagy William-féle próba, a páronkénti összehasonlításoknál pedig Dunnett-féle próba. A megfelelő statisztikai elemzési módszer kiválasztásakor a vizsgálónak figyelemmel kell lennie a lehetséges varianciaegyenlőtlenségekre és más kapcsolódó problémákra, amelyek miatt az adatok transzformációjára vagy nem paraméteres statisztikai elemzésre lehet szükség. A vizsgálónak minden esetben el kell végeznie az SI-k kiszámítását és statisztikai elemzéseket bizonyos adatpontokkal (az úgynevezett »kiugró adatokkal») és azok nélkül.

## ADATOK ÉS JELENTÉS

### Adatok

34. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, feltüntetve az egyedi állatok BrdU jelölési indexének értékeit, a csoport átlagos BrdU jelölés/állat értékét, a hozzá tartozó hibamutatóval (például SD, SEM), valamint az egyes dóziscsoportokban kapott átlagos stimulációs indexeket (SI) összehasonlítva a párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollcsoportéval.

### Vizsgálati jelentés

35. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyagok és kontrollanyagok:

- azonosító adatok (pl. adott esetben a CAS-szám és az EU-szám; eredet; tisztaság; ismert szennyezők; tételszám),
- fizikai megjelenés és fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. illékonyaság, stabilitás, oldhatóság),
- elegy esetén annak összetétele és az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya,

Oldószer/vivőanyag:

- azonosító adatok (adott esetben tisztaság; koncentráció; alkalmazott térfogat),
- a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

Kísérleti állatok:

- CBA egértörzs származása,
- az állatok mikrobiológiai státusa, amennyiben ismert,
- az állatok száma és életkora,
- az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.,

Vizsgálati körülmények:

- az ELISA készlet esetében a származás, a tételszám, a gyártó minőségbiztosítási/minőség-ellenőrzési adatai (antitest szenzitivitása és specifitása, illetve a kimutatási határ),
- a vizsgált anyagból előállított készítménnyel és annak alkalmazásával kapcsolatos adatok,
- a dózisszintek megválasztásának indoklása (ezen belül adott esetben az előszűrési vizsgálatok eredményei),
- a vivőanyag és a vizsgált anyag alkalmazott koncentrációja, valamint a vizsgált anyagból alkalmazott teljes mennyiség,
- a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete),
- a kezelés adatai és a mintavételek ütemezése,
- a toxicitás mérésére alkalmazott módszerek,

- a pozitív és negatív vizsgálati eredmény kimondásának kritériumai,
- a protokolltól való esetleges eltérések adatai, és annak kifejtése, hogy az eltérés hogyan érintheti vizsgálati tervet és az eredményeket,

A megbízhatóság ellenőrzése:

- a legutóbbi megbízhatósági ellenőrzés eredményeinek összefoglalása az alkalmazott anyag, koncentráció és vivőanyag adataival együtt,
- a vizsgálólaboratórium párhuzamosan és/vagy korábban vizsgált pozitív és párhuzamosan vizsgált negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollokra vonatkozó adatai,
- ha nem vizsgáltak párhuzamosan pozitív kontrollt, a laboratóriumban legutóbb végzett időszakos pozitív kontroll dátuma és laboratóriumi jelentése, valamint pozitív kontroll vizsgálatának korábbi adatait részletező jelentés, amely indokolja, hogy miért nem végzik a laboratóriumban pozitív kontroll párhuzamos vizsgálatát,

Eredmények:

- az egyes állatok testtömege a kezelés kezdetén és a humánusan történő exterminálás tervezett időpontjában, illetve az átlagos és vonatkozó hibamutatók (pl. SD, SEM) kezelési csoportonként,
- a toxicitási tünetek, ezen belül az alkalmazás helyén esetleg kialakuló bőrirritáció megjelenésének időpontja és időbeli alakulása minden egyes állatra vonatkozóan, amennyiben volt ilyen,
- az állatonkénti BrdU jelölési indexek és kezelési csoportonkénti SI értékek táblázata,
- átlagos és kapcsolódó hibamutatók (pl. SD, SEM) az állatonkénti BrdU jelölési index esetében, az egyes kezelési csoportokban, és a kiugró értékek elemzése az egyes kezelési csoportokban,
- a kiszámított SI és a variabilitás megfelelő mutatója, amely az egyedek közti variabilitást a vizsgált anyaggal kezelt csoportban és a kontrollcsoportokban egyaránt figyelembe veszi,
- dózis-válasz összefüggés,
- adott esetben statisztikai elemzések,

Az eredmények tárgyalása:

- rövid kommentár az eredményekhez, a dózis-válasz elemzéshez és adott esetben a statisztikai elemzésekhez, és következtetés levonása arra vonatkozóan, hogy a vizsgált anyagot bőrszenzibilizáló hatásúnak kell-e tekinteni vagy sem.

#### SZAKIRODALOM

- (1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.

- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Elektronikus formátumban: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna/llnarep.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf)]
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 258-273.
- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249-257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA:BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>]
- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/LLNAPRPRpt2009.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRpt2009.pdf)]
- (12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.
- (13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf)]
- (18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].

- (23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Elektronikus formátumban: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox\\_workshop.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm)].
- (31) 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 Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

### 1. függelék

#### FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

**Pontosság:** A vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az »egyezés« megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (33).

**Referenciaanyag:** A vizsgált anyaggal való összehasonlítás céljából etalonként használt szenzibilizáló vagy nem szenzibilizáló anyag. A referenciaanyaggal szemben a következő elvárások fogalmazhatók meg: i. állandó és megbízható beszerzési forrásból vagy forrásokból kell származnia; ii. a vizsgált anyagok csoportjához hasonló szerkezettel és funkcionális jellemzőkkel kell rendelkeznie; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állniuk az anyag ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v. a kívánt válaszreakciók tartományában ismert hatásúnak kell lennie.

**Álnegatív eredmény:** Valamely vizsgálati módszerrel tévesen negatívnak vagy inaktívnak minősített vizsgált anyag, amely valójában pozitív vagy aktív (33).

**Álpozitív:** Valamely vizsgálattal tévesen pozitívnak vagy aktívnak minősített vizsgált anyag, amely valójában negatív vagy inaktív (33).

**Veszély:** Káros egészségügyi vagy ökológiai hatások előidézésének lehetősége. A káros hatás csak akkor jelenik meg, ha kellő szintű az expozíció.

**Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság:** Annak mértéke, hogy a különböző minősített laboratóriumok azonos protokoll és azonos vizsgált anyag alkalmazásával mennyire képesek minőségileg és mennyiségileg azonos eredményeket produkálni. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság az előhitelesítési és hitelesítési folyamat során kerül meghatározásra, és annak mértékét jelzi, hogy az adott vizsgálat mennyire sikeresen vihető át laboratóriumok között; más néven laboratóriumok közötti megismételhetőség (33).

*Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság:* Annak meghatározása, hogy az ugyanazon laboratóriumban dolgozó képzett személyek meghatározott protokoll különböző időpontokban történő alkalmazásával mennyire sikeresen tudják reprodukálni az eredményeket. Más néven laboratóriumon belüli megismételhetőség (33).

*Kiugró érték:* A kiugró érték olyan megfigyelés, amely szembetűnően eltér az egy populációból vett véletlenszerű minta egyéb értékeitől.

*Minőségbiztosítás:* Irányítási folyamat, amelynek során a laboratóriumi vizsgálati szabványok és követelmények betartását, a jegyzőkönyvek vezetését, valamint az adattovábbítás pontosságát a vizsgálatot végző személyektől független személyek ellenőrzik.

*Megbízhatóság:* Azonos protokoll szerint végzett vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóságának mérésére szolgál. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (33).

*Bőrszenzibilizáció:* Immunológiai folyamat, amely akkor jelentkezik, ha egy érzékeny egyén lokálisan érintkezik valamely indukáló hatású allergén vegyi anyaggal, amely esetlegesen kontakt szenzibilizáció kialakulásához vezető immunválaszt vált ki a bőrben.

*Stimulációs index (SI):* Adott vizsgált anyag bőrszenzibilizációt okozó képességének meghatározására kiszámított érték, amely az anyaggal kezelt csoportban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportban tapasztalt proliferáció aránya.

*Vizsgált anyag (más néven vizsgált vegyi anyag):* Bármilyen anyag vagy keverék, amelyet ezzel a vizsgálati módszerrel vizsgálnak.”

---