

II

(Įstatymo galios neturintys teisės aktai)

REGLAMENTAI

KOMISIJOS REGLAMENTAS (ES) Nr. 640/2012

2012 m. liepos 6 d.

kuriuo iš dalies keičiamas Reglamentas (EB) Nr. 440/2008, nustatantis bandymų metodus pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), siekiant jį suderinti su technikos pažanga

(Tekstas svarbus EEE)

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 2006 m. gruodžio 18 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), įsteigiantį Europos cheminių medžiagų agentūrą, iš dalies keičiantį Direktyvą 1999/45/EB bei panaikinantį Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 793/93, Komisijos reglamentą (EB) Nr. 1488/94, Tarybos direktyvą 76/769/EEB ir Komisijos direktyvas 91/155/EEB, 93/67/EEB, 93/105/EB bei 2000/21/EB⁽¹⁾, ypač į jo 13 straipsnio 3 dalį,

kadangi:

(1) Komisijos reglamente (EB) Nr. 440/2008⁽²⁾ pateikti bandymų metodai, kuriais, taikant Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006, turi būti nustatomos cheminių medžiagų fizikinės ir cheminės savybės, toksiškumas ir ekotoksiškumas;

(2) Reglamentą (EB) Nr. 440/2008 būtina atnaujinti įtraukiant į jį prioritetinius naujus ir atnaujintus neseniai OECD patvirtintus alternatyvius bandymų metodus, taip siekiant sumažinti eksperimentiniais tikslais naudojamų gyvūnų skaičių, kaip nustatyta 2010 m. rugsėjo 22 d.

Europos Parlamento ir Tarybos direktyvoje 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos⁽³⁾ ir 1986 m. lapkričio 24 d. Tarybos direktyvoje 86/609/EEB dėl valstybių narių įstatymų ir kitų teisės aktų, susijusių su eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsauga, suderinimo⁽⁴⁾. Dėl šio projekto konsultuotasi su suinteresuotosiomis šalimis;

(3) todėl reikėtų atitinkamai iš dalies pakeisti Reglamentą (EB) Nr. 440/2008;

(4) šiame reglamente numatytos priemonės atitinka pagal Reglamento (EB) Nr. 1907/2006 133 straipsnį įsteigto komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

1 straipsnis

Reglamento (EB) Nr. 440/2008 priedas iš dalies keičiamas pagal šio reglamento priedą.

2 straipsnis

Šis reglamentas įsigalioja trečią dieną po jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

(¹) OL L 396, 2006 12 30, p. 1.

(²) OL L 142, 2008 5 31, p. 1.

(³) OL L 276, 2010 10 20, p. 33.

(⁴) OL L 358, 1986 12 18, p. 1.

Šis reglamentas yra privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje 2012 m. liepos 6 d.

Komisijos vardu
Pirmininkas
José MANUEL BARROSO

PRIEDAS

Reglamento (EB) Nr. 440/2008 priedas iš dalies keičiamas taip:

1. B.42 skyrius keičiamas taip:

„B.42. ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO BANDYMAS

IVADAS

1. OECD Cheminių medžiagų bandymo gairės ir jomis pagrįsti ES bandymo metodai periodiškai persvarstomi atsižvelgiant į mokslo pažangą, kintančias reguliavimo reikmes ir gyvūnų gerovės sumetimais. Anksčiau buvo patvirtintas pradinis bandymo metodas (BM) pelių odos jautrinimui nustatyti – vietinio limfmazgio bandymas (angl. *Local Lymph Node Assay*, LLNA; OECD bandymų metodika 429; šio priedo B.42 skyrius)(1). LLNA tinkamumo patvirtinimas ir susijusių darbų apžvalga paskelbta (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) šaltiniuose. Atnaujintas LLNA pagrįstas patirties ir mokslinių duomenų įvertinimu (12). Tai yra antrasis BM, parengtas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) sukeliama gyvūnų odos jautrinimo potencialui įvertinti. Pagal kitą BM (t. y. OECD bandymų metodika 406; šio priedo B.6 skyrius) taikomi bandymai su jūros kiaulytėmis, pirmiausia maksimizacijos ir Buehlerio bandymas su jūros kiaulytėmis (13). LLNA turi tam tikrų pranašumų prieš B.6 ir OECD bandymų metodiką 406 (13) gyvūnų gerovės prasme. Šis atnaujintas LLNA bandymų metodas apima rinkinį naudojimo charakteristikų standartų (angl. *Performance Standards*, PS) (1 priedėlis), kuriuos galima taikyti naujų ir (arba) modifikuotų bandymo metodų, kurie funkciškai ir mechanistiškai panašūs į LLNA, tinkamumo patvirtinimo būklei įvertinti, laikantis OECD rekomendacinio dokumento Nr. 34 (14).
2. LLNA tiriamas odos jautrinimo indukcinis etapas ir gaunami kiekybiniai duomenys, tinkami dozės ir atsako sąryšiui įvertinti. Reikia pažymėti, kad silpni arba vidutiniai jautrikliai, kurie yra rekomenduoti kaip tinkamos teigiamo poveikio kontrolinės medžiagos (angl. *positive control chemicals*, PC) bandymams su jūrų kiaulytėmis (t. y. B. 6; OECD bandymų metodika 406) (13), tinka naudoti LLNA metodui (6) (8) (15). Šiame BM kaip vienas iš variantų aprašytas ir sumažintojo LLNA (rLLNA) metodas, kurį taikant galima būtų naudoti iki 40 % mažiau gyvūnų (16) (17) (18). rLLNA gali būti taikomas, kai reguliavimo reikmėms būtina patvirtinti odos jautrinimo potencialo neigiamą prognozę, jei laikomasi visų kitų LLNA protokolo specifikacijų, aprašytų šiame BM. Neigiamo rezultato prognozė turi būti grindžiama visa turima informacija, kaip aprašyta 4 skirsnyje. Prieš taikant rLLNA metodą, turi būti pateikiamas jo taikymo aiškus pagrindimas ir loginis pagrindas. Jei, skirtingai, nei tikėtasi, atliekant rLLNA gaunamas teigiamas arba dviprasmiškas rezultatas, gali prireikti papildomų bandymų rezultatams išaiškinti arba patikslinti. rLLNA neturėti būti taikomas odą jautrinančių bandomųjų medžiagų pavojingumui nustatyti, kai reikalinga informacija apie dozės ir atsako sąryšį, pvz., skirstant į kategorijas pagal Reglamentą (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo ir JT pasaulinės suderintos cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemos.

APIBRĖŽTYS

3. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 2 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

4. LLNA yra pakaitinis metodas potencialiai odą jautrinančioms cheminėms medžiagoms nustatyti. Nereikia manyti, kad visais atvejais vietoj bandymo su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (13), reikia taikyti LLNA bandymą; tai labiau reiškia, kad šis bandymas yra lygiavertis ir gali būti taikomas kaip pakaitinis metodas, pagal kurį teigiamų ir neigiamų rezultatų paprastai nebereikia papildomai patvirtinti. Prieš atlikdama tyrimą, bandymų laboratorija turi apsvarstyti visą turimą informaciją apie bandomąją medžiagą. Tokia informacija apima bandomosios medžiagos tapatumą ir cheminę struktūrą, jos fizikines ir chemines savybes, visų kitų bandomosios medžiagos *in vitro* arba *in vivo* toksiškumo bandymų rezultatus ir giminingos struktūros medžiagų toksikologinius duomenis. Ši informacija turi būti apsvarstyta, siekiant nustatyti, ar LLNA tinka medžiagai bandyti (atsižvelgiant į tam tikrų medžiagų tipų nesuderinamumą su LLNA – žr. 5 skirsnį), ir siekiant parinkti tinkamą dozę.
5. LLNA yra *in vivo* metodas, todėl alerginiam kontaktiniam jautrinimui įvertinti naudojami gyvūnai. Tačiau taikant šį metodą yra galimybė sumažinti šiam tikslui reikalingų gyvūnų skaičių. Be to, LLNA yra iš esmės geresnis gyvūnų naudojimo būdas (kelia mažiau skausmo ir kančių) bandant alerginį kontaktinį jautrinimą. LLNA yra pagrįstas imunologinių reiškinų, kuriuos cheminės medžiagos sukelia jautrinimo indukcijos etapu, nagrinėjimu. Kitaip nei darant bandymus su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (13), taikant LLNA nereikia sukelti ypač didelio odos jautrumo reakcijų. Be to, taikant LLNA nereikia naudoti adjuvantų, kurie reikalingi darant maksimizacijos bandymą su jūrų kiaulytėmis (13). Taigi LLNA sumažina gyvūnų skausmą ir kančias. Nepaisant LLNA pranašumų prieš B.6 ir OECD bandymų metodiką 406, reikia pripažinti, kad yra tam tikrų apribojimų, dėl kurių gali tekti taikyti B.6 ir OECD bandymų metodiką 406 (13) (pvz., klaidingi neigiami rezultatai tiriant kai kuriuos metalus LLNA metodu, klaidingi teigiami rezultatai tiriant tam tikrus odos dirgiklius (pvz., kai kurias

paviršinio aktyvumo medžiagų tipo cheminės medžiagos))(19) (20), arba bandomosios medžiagos tirpumas). Be to, dėl cheminių medžiagų klasių arba medžiagų, kuriose yra funkcinių grupių, veikiančių kaip galimos klaidinančiosios medžiagos (21), gali tekti atlikti bandymus su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (13). Nėgana to, remiantis ribota tinkamumo patvirtinimo duomenų baze, kurią daugiausia sudaro pesticidų preparatai, pastarojo tipo bandomųjų medžiagų atveju labiau tikėtinas teigiamas rezultatas taikant LLNA, nei bandymą su jūros kiaulytėmis (22). Tačiau, kai bandomi preparatai, galima apsvarstyti galimybę įtraukti keletą panašių medžiagų, kurių rezultatai žinomi, kaip palyginamąsias medžiagas, ir taip įrodyti, kad LLNA yra tinkamas (žr. 16 skirsnį). Išskyrus tokius nustatytus apribojimus, LLNA taikytinas bandant bet kurias medžiagas, nebent tos medžiagos turi tokių savybių, dėl kurių sumažėtų LLNA tikslumas.

BANDYMO METODO PRINCIPAS

6. Pagrindinis principas, kuriuo pagrįstas LLNA metodas, yra jautriklių sukelta pirminė limfocitų proliferacija medžiagos poveikio vietą drenuojančiame limfmazgyje. Ši proliferacija yra proporcinga naudojamai dozei ir alergeno gebai jautrinti, taigi tai yra paprastas būdas objektyviai ir kiekybiškai išmatuoti jautrinimą. Proliferacija įvertinama palyginant vidutinę proliferaciją bandymo grupėse ir nešikliu paveiktose kontrolinėse (angl. *vehicle treated control*, VC) grupėse. Nustatomas vidutinės proliferacijos paveiktose grupėse ir lygiagrečiose VC grupėse santykis, vadinamas dirginimo rodikliu (angl. *Stimulation Index*, SI), kuris turi būti ≥ 3 , kad bandomoji medžiaga galėtų būti toliau vertinama kaip galimas odos jautriklis. Čia aprašyti metodai yra pagrįsti *in vivo* radioaktyviųjų indikatorių naudojimu padidėjusiam proliferuojančių ląstelių skaičiui išmatuoti drenuojančiuose ausų limfmazgiuose. Tačiau gali būti naudojami kiti parametrai proliferuojančių ląstelių skaičiui įvertinti, jei visiškai laikomasi PS reikalavimų (1 priedelis).

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšių parinkimas

7. Šiam bandymui pasirinkta gyvūnų rūšis – pelės. Naudojamos suaugusios CBA/Ca arba CBA/J veislės pelių patelės, kurios yra neturėjusios vadų ir neapvaisintos. Pradedant bandymą, gyvūnų amžius turi būti 8–12 savaičių, o gyvūnų masės skirtumas turi būti kuo mažesnis ir neviršyti 20 % vidutinės masės. Galima naudoti kitas veisles ir patinus, jei yra gauta pakankamai duomenų, kurie rodytų, kad nėra esminių veislei ir (arba) lyčiai būdingų atsako į LLNA skirtumų.

Laikymo ir šėrimo sąlygos

8. Pelės turi būti laikomos grupėmis (23), nebent pateikiamas pakankamas loginis pagrindas, kodėl peles reikia laikyti atskirai. Patalpos, kurioje laikomi bandomieji gyvūnai, temperatūra turi būti 22 ± 3 °C. Nors santykinė oro drėgmė turi būti ne mažesnė 30 % ir, pageidautina, ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, siektina, kad drėgmė būtų 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis, taikant 12 val. šviesos ir 12 val. tamsos ciklą. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio.

Gyvūnų ruošimas

9. Gyvūnai pasirenkami atsitiktinai, ženklinami, kad būtų įmanoma kiekvieną identifikuoti (tačiau netaikomas joks ausų ženklinimas), ir laikomi narveliuose mažiausiai 5 paras prieš pradedant taikyti dozes, kad galėtų priprasti prie laboratorijos sąlygų. Prieš veikimo medžiaga pradžią visi gyvūnai apžiūrimi, ar neturi pastebimų odos pažeidimų.

Dozavimo tirpalų paruošimas

10. Prieš užtepant ant pelių ausų, kietosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba paskleidžiamos tirpikliuose / nešikliuose ir, jei reikia, atskiedžiamos. Skystos cheminės medžiagos gali būti užtepamos grynos arba atskiestos. Netirpios cheminės medžiagos, pvz., tos, kurių paprastai pasitaiko medicinos įrangoje, prieš užtepant ant pelių ausų, padidintosios ekstrakcijos būdu išskiriamos atitinkamame tirpiklyje, kad būtų gautos visos galimos išskirti sudedamosios dalys. Bandomosios medžiagos paruošiamos kasdien, nebent stabilumo duomenys rodo, kad jas galima laikyti ilgesnį laiką.

Patikimumo tikrinimas

11. Teigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos (angl. *positive control chemicals*, PC) naudojamos siekiant parodyti tyrimo tinkamumą joms reaguojant pakankamu ir atkartojamu jautrumu kaip jautrinančioms bandomosioms medžiagoms, kurių atsako dydis gerai apibūdinamas. Naudoti lygiagrečias PC rekomenduojama todėl, kad taip gali būti įrodyta laboratorijos kompetencija sėkmingai atlikti bandymą per kiekvieną tyrimą ir įvertinti atkuriamumą ir palyginamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų. Kiekvieno tyrimo metu naudoti PC reikalauja ir kai kurios reguliavimo institucijos, todėl naudotojai raginami pasikonsultuoti su atitinkamomis institucijomis prieš vykdydami LLNA. Taigi, skatinama įprastai naudoti lygiagrečią PC, kad būtų išvengta papildomų bandymų su

- gyvūnais, reikalingų laikytis reikalavimų, kuris gali kilti PC naudojant tik periodiškai (žr. 12 skirsnį). PC turi sukelti teigiamą LLNA atsaką esant tokiam poveikio lygiui, kad SI padidėtų iki daugiau kaip 3, palyginti su neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos (angl. *negative control*, NC) grupe. PC dozė turi būti parenkama taip, kad nesukeltų per didelio odos sudirginimo ar sisteminio toksiškumo, o atsako sukėlimas būtų atkuriamas, bet ne per didelis (t. y. SI > 20 būtų per didelis). Tinkamiausias PC yra 25 % heksilcinamono aldehidas (Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos [CAS] Nr. 101–86–0) acetono ir alyvų aliejaus mišinyje (4:1 tūrio dalys) ir 5 % merkaptobenziazolas (CAS Nr. 149–30–4) N,N-dimetilformamidas (žr. 1 priedėlio 1 lentelę). Gali pasitaikyti aplinkybių, kai, pateikus pakankamai įrodymų, galima naudoti kitas PC, atitinkančias pirmiau nurodytus kriterijus.
12. Nors naudoti lygiagrečią PC grupę rekomenduojama, gali būti situacijų, kuriomis gali pakakti periodinių PC bandymų (t. y. ≤ 6 mėnesių intervalais), jei tai laboratorijos, kurios reguliariai atlieka LLNA (t. y. atlieka LLNA ne rečiau kaip kartą per mėnesį) ir turi anksčiau atliktų PC bandymų duomenų bazę, kuri būtų įrodymas, kad laboratorijoje gaunami atkuriami ir tikslūs rezultatai su PC. Pakankamas profesionalumas atliekant LLNA tyrimus gali būti sėkmingai įrodomas nuolat gaunant teigiamus rezultatus naudojant PC ne mažiau kaip 10-yje nepriklausomų bandymų, atliktų per pagrįstą laikotarpį (t. y. trumpesnę kaip vieneri metai).
13. Lygiagreti PC visada turi būti naudojama, jei yra procedūrinių LLNA pakeitimų (pvz., pasikeitė kvalifikuoti darbuotojai, pakeistos bandymo metodo medžiagos ir (arba) reagentai, pakeista bandymo metodo įranga, pakeistas bandomųjų gyvūnų tiekėjas); tokie pakeitimai turi būti užregistruoti laboratorijos ataskaitoje. Turi būti apsvarstytas tokių pasikeitimų poveikis anksčiau sukauptų duomenų bazės tinkamumui, vertinant būtinybę sukurti naują anksčiau sukauptų duomenų bazę, skirtą PC rezultatų nuoseklumui dokumentuoti.
14. Tyrėjai turi suprasti, kad sprendimas vykdyti PC tyrimą periodiškai, o ne nuolat, turi padarinių neigiamų tyrimų rezultatų, gautų be lygiagrečios PC naudojimo, laikotarpiu tarp kiekvieno periodinio PC tyrimo, tinkamumui ir priimtinumui. Pvz., jei, atliekant periodinį PC tyrimą, gaunamas klaidingas neigiamas rezultatas, gali būti kvestionuojami neigiami bandomosios medžiagos rezultatai, gauti laikotarpiu nuo paskutinio priimtino periodinio PC tyrimo iki nepriimtino periodinio PC tyrimo. Šių rezultatų padariniai turi būti stropiai įvertinti sprendžiant, ar nuolat vykdyti lygiagrečius, ar tik periodinius PC tyrimus. Taip pat reikia apsvarstyti galimybę lygiagrečios PC grupės tyrimams naudoti mažiau gyvūnų, jei tai moksliskai pateisinama ir jei laboratorija savo anksčiau sukauptais duomenimis įrodo, kad galima naudoti mažiau pelių (12).
15. Nors PC turi būti bandoma nešiklyje, apie kurį žinoma, kad jis sukelia pastovų atsaką (pvz., acetono ir alyvų aliejaus mišinyje; 4:1 tūrio dalys), gali būti tam tikrų reguliavimo situacijų, kai gali prireikti ištirti ir nestandartinį nešiklį (kliniškai ir (arba) chemiškai susijusį preparatą) (24). Jei lygiagreti PC bandoma kitokiame nešiklyje nei bandomoji medžiaga, turi būti naudojama atskira VC (nešiklio kontrolinė cheminė medžiaga), skirta lygiagrečiai PC.
16. Tais atvejais, kai vertinamos tam tikrai cheminių medžiagų klasei ar atsakų sričiai priklausančios bandomosios medžiagos, gali būti naudojamos ir palyginamosios medžiagos, kad būtų parodyta, jog bandymo metodas tinkamai veikia nustatant šių bandomųjų medžiagų odos jautrinimo potencialą. Atitinkamos palyginamosios medžiagos turi pasižymėti šiomis savybėmis:
- struktūriniu ir funkcinu panašumu į bandomosios medžiagos klasę,
 - žinomomis fizinėmis ir (arba) cheminėmis charakteristikomis,
 - apie jas turi būti patvirtinančių duomenų, gautų LLNA tyrimais,
 - apie jas turi būti patvirtinančių duomenų, gautų taikant kitus bandymų su gyvūnais modelius ir (arba) iš žmonių.

BANDYMO EIGA

Gyvūnų skaičius ir dozių dydis

17. Vienai dozės grupei naudojami ne mažiau kaip keturi gyvūnai, naudojant ne mažiau kaip tris bandomosios medžiagos koncentracijas ir vieną lygiagrečią NC (neigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos) grupę, paveikiamą tik bandomosios medžiagos nešikliu, ir PC (lygiagrečią arba naujausią, remiantis laboratorijos politika pagal 11–15 skirsnius). Reikia apsvarstyti poreikį išbandyti keletą PC dozių, ypač bandant PC periodiškai. Išskyrus tai, kad jie neveikiami bandomąja medžiaga, kontrolinių grupių gyvūnų priežiūra ir elgesys su jais turi nesiskirti nuo poveikio grupės gyvūnų.

18. Dozė ir nešiklis turi būti parenkami laikantis (3) ir (5) šaltiniuose pateikiamų rekomendacijų. Paeilinės dozės paprastai parenkamos iš atitinkamos koncentracijos verčių eilės, pvz., 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ir t. t. Taikoma koncentracijos verčių eilė turi turėti turėti tinkamą loginį pagrindą. Reikia atsižvelgti į visą turimą toksikologinę informaciją (pvz., apie ūminį toksiškumą ir odos dirginimą) ir struktūrinę bei fizikinių ir cheminių savybių informaciją apie dominančią bandomąją medžiagą (ir (arba) struktūriškai panašias medžiagas), kad trys iš eilės taikomos koncentracijos vertės būtų parinktos taip, kad didžiausios koncentracijos poveikis būtų kuo didesnis, bet būtų išvengta sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo (3) (25). Jei tokios informacijos neturima, gali prireikti pradinio atrankinio bandymo (žr. 21–24 skirsnius).
19. Nešiklis neturi daryti įtakos bandymo rezultatui ar jį iškraipyti ir turi būti parinktas taip, kad būtų kuo geresnis tirpumas, siekiant gauti didžiausią įmanomą koncentraciją gaminant tirpalą arba suspensiją, tinkamą bandomajai medžiagai užtepti. Rekomenduojami nešikliai yra acetono ir alyvų aliejaus mišinys (4:1 tūrio dalys), N,N-dimetilformamidas, metiletiketonas, propilenglikolis ir dimetilsulfoksidas (19), tačiau galima naudoti kitus nešiklius, jei pateikiamas tinkamas loginis pagrindas. Tam tikrais atvejais papildomai kontrolei gali tekti naudoti klinikiniu požiūriu atitinkantį tirpiklį arba komercinį preparatą, turintį bandomosios medžiagos. Reikia ypač stengtis užtikrinti, kad nešiklyje būtų hidrofilinių bandomųjų medžiagų, kurios drėkintų odą ir iš karto nutekėtų, įdedant soliubilizavimo priemonių (pvz., 1 % „Pluronic® L92“). Taigi reikia vengti naudoti grynai vandeninius nešiklius.
20. Apdorojant atskirų pelių limfmazgius galima įvertinti gyvūnų variantiškumą ir statistškai palyginti skirtumus tarp bandomosios medžiagos ir VC grupės matavimo rezultatų (žr. 35 skirsnį). Be to, kai surenkami atskirų gyvūnų duomenys, realu įvertinti galimybę sumažinti pelių skaičių PC grupėje 12. Be to, kai kurios reguliavimo institucijos reikalauja rinkti atskirtų gyvūnų duomenis. Vis dėlto kai kurioms reguliavimo institucijoms gali būti priimtini jungtiniai gyvūnų duomenys ir tokiais atvejais tyrėjai gali turėti pasirinkimą rinkti atskirų gyvūnų arba jungtinius duomenis.

Atrankinis bandymas

21. Jei neturima informacijos, pagal kurią galima nustatyti didžiausią bandomą dozę (žr. 18 skirsnį), reikia atlikti atrankinį bandymą, kad būtų nustatytas tinkamas dozės lygis atliekant LLNA. Atrankinio bandymo tikslas – nustatyti gaires didžiausiam pagrindinio LLNA tyrimo dozės lygiui parinkti, kai neturima informacijos apie koncentraciją, kuri sukelia sisteminį toksiškumą (žr. 24 skirsnį) ir (arba) per didelį vietinį odos dirginimą (žr. 23 skirsnį). Didžiausias bandomas dozės lygis turi būti 100 % bandomosios medžiagos, jei tai skysčiai, arba didžiausia įmanoma koncentracija, jei tai kietosios medžiagos ar suspensijos.
22. Atrankinis bandymas atliekamas tokiais pačiomis sąlygomis kaip ir pagrindinis LLNA tyrimas, išskyrus tai, kad nevertinama limfmazgių proliferacija ir galima tirti mažiau gyvūnų kiekvienoje dozės grupėje. Siūloma naudoti vieną arba du gyvūnus vienai dozės grupei. Visos pelės kasdien stebimos, ar poveikio vietoje nepasireiškia sisteminio toksiškumo ar vietinio dirginimo klinikiniai požymiai. Kūno masė užrašoma prieš bandymą ir prieš jį pabaigiant (6 dieną). Abi kiekvienos pelės ausys stebimos, ar nėra eritemos ir įvertinama pagal 1 lentelę (25). 1 dieną (prieš dozę), 3 dieną (praėjus maždaug 48 val. po pirmosios dozės) ir 6 dieną stomačiu (pvz., skaitmeniniu mikrometru arba ciferblatinio storio matuokliu) atliekami ausų storio matavimai. Be to, 6 dieną ausų storis gali būti įvertinamas pagal ausų skylamušio svorio matavimus, atliekamus po to, kai gyvūnai humaniškai numarunami. Per didelį vietinį odos dirginimą rodo ≥ 3 edemos įvertis ir (arba) ≥ 25 % ausies storio padidėjimas bet kurią matavimo dieną (26) (27). Didžiausia pagrindiniam LLNA tyrimui parenkama dozė yra antra pagal dydį dozė iš atrankinio bandymo koncentracijų eilės (žr. 18 skirsnį), nesukelianti sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo.

1 lentelė

Eritemos įverčiai

Pastebėjimas	Įvertis
Eritemos nėra	0
Labai nedidelė eritema (vos pastebima)	1
Aiški eritema	2
Nuo vidutinės iki sunkios eritemos	3
Nuo sunkios eritemos (buroko raudonumo) iki šašo susidarymo, kuomet nebeįmanoma įvertinti eritemos sunkumo	4

23. Taikant LLNA metodą, dirgikliams nustatyti, be ausų storio padidėjimo 25 % (26) (27), naudojamas ir statistiškai reikšmingas paveiktų pelių ausų storio padidėjimas, palyginti su kontrolinėmis pelėmis (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Vis dėlto, nors statistiškai reikšmingas padidėjimas galimas ir ausies storiui esant mažesniai kaip 25 %, tai nėra siejama konkrečiai su per dideliu dirginimu (30) (32) (33) (34).
24. Toliau išvardyti klinikiniai požymiai gali rodyti sisteminių toksiskumą (35) (36), kai yra naudojami kaip integruoto vertinimo dalis, todėl gali nurodyti didžiausią dozės lygį, skirtą pagrindiniam LLNA: nervų sistemos funkcijos pokyčiai (pvz., piloerekcija, ataksija, drebulys ir konvulsijos); elgsenos pokyčiai (pvz., agresyvumas, prausimosi pokyčiai, žymus aktyvumo lygio pokytis); kvėpavimo pokyčiai (t. y. kvėpavimo dažnio ir intensyvumo pokyčiai, pvz., dusulys, žiopčiojimas ir karkalai) ir edalo bei vandens vartojimo pokyčiai. Be to, vertinant turi būti atsižvelgiama į letargijos ir (arba) nereagavimo požymius ir bet kokius didesnio už nedidelį ar trumpalaikį skausmą ir kančią klinikinį požymius arba > 5 % kūno masės sumažėjimą nuo 1 iki 6 dienos, ir į nugaišimą. Gaištantys ar akivaizdžiai skausmą patiriantys ar didelės ir ilgalaikės kančios požymius rodantys gyvūnai turi būti humaniškai numarinti (37).

Pagrindinio bandymo eksperimentinis planas

25. Eksperimentinis bandymo planas atrodo taip:

- 1 diena. Atskirai nustatoma ir užrašoma kiekvieno gyvūno masė ir bet kokie klinikiniai pastebėjimai. Ant kiekvienos ausies išorinės pusės užtepama 25 μ l atitinkamai atskiesto bandomosios medžiagos tirpalo, vien tik nešiklio arba PC (lygiagrečios arba naujausios, remiantis laboratorijos politika pagal 11–15 skirsnius).
- 2 ir 3 dienos. Pakartojama 1 dieną daryta procedūra.
- 4 ir 5 dienos. Jokio veikimo.
- 6 diena. Užrašoma kiekvieno gyvūno masė. Į visų tiriamųjų ir kontrolinių pelių uodegos veną suleidžiama 250 μ l sterilus valgomosios druskos ir fosfatinio buferio tirpalo (angl. *phosphate-buffered saline*, PBS), kuriame yra 20 μ Ci ($7,4 \times 10^5$ Bq) tričiu prisotinto (3 H)-metiltimidino. Arba į visų pelių uodegos veną galima suleisti 250 μ l sterilus PBS, kuriame yra 2 μ Ci ($7,4 \times 10^4$ Bq) 125 I-jododeoksiuridino ir 10^{-3} M fluorodeoksiuridino. Po penkių valandų (5 h) gyvūnai humaniškai numarunami. Kiekvienos pelės drenuojamieji ausų limfmazgiai išpjaujami ir kiekvieno gyvūno apdorojami PBS (atskirų gyvūnų metodu); pagal kitą metodą galima išpjauti limfmazgius iš kiekvienos bandymo grupės visų gyvūnų ausų ir kartu sudėti į PBS (jungtinių poveikio grupių metodu). Limfmazgių identifikavimo ir skrodimo aprašą bei schemas galima rasti (12) šaltinyje. Norint toliau stebėti vietinį odos atsaką pagrindiniame tyrime, į tyrimo protokolą gali būti įtraukti tokie papildomi parametrai kaip ausų eritemos įverčiai arba ausų storio matavimo rezultatai (gauti storio matavimais arba ausų skylamušio svorio matavimais atliekant nekroskopiją).

Ląstelių suspensijos ruošimas

26. Limfmazgių ląstelių (angl. *lymph node cells*, LNC), išpjautų iš vieno gyvūno abiejų ausų pagal atskirų gyvūnų metodą arba iš visų gyvūnų ausų pagal jungtinių poveikio grupių metodą, pavienių ląstelių suspensija paruošiama švelniai mechanškai susmulkinant pro 200 μ m nerūdijančio plieno tinklėlį ar kitu priimtiniu pavienių ląstelių suspensijos sudarymo metodu. LNC du kartus plaunamos gausiu PBS kiekiu ir DNR nusodinamos 5 % trichloracto rūgštimi (angl. *trichloroacetic acid*, TCA) 4 °C temperatūroje 18 h (3). Nuosėdos vėl suspenduojamos 1 ml TCA ir suspensija supilama į scintiliacinį mėgintuvėlį su 10 ml scintiliacinio skysčio siekiant suskaičiuoti 3 H, arba tiesiai į mėgintuvėlį gama impulsams skaičiuoti siekiant nustatyti 125 I.

Ląstelių proliferacijos nustatymas (radioaktyviųjų jungtinių patekimas)

27. 3 H-metiltimidino patekimas matuojamas skaičiuojant β scintiliacijas kaip skilimų skaičių per minutę (angl. *disintegrations per minute*, DPM). 125 I-jododeoksiuridino patekimas matuojamas skaičiuojant 125 I ir išreiškiamas kaip DPM. Atsižvelgiant į taikomą metodą, patekimas bus išreiškiamas DPM / pelei (atskirų gyvūnų metodu) arba DPM / poveikio grupei (jungtinių poveikio grupių metodu).

Sumažintasis LLNA

28. Kai kuriais atvejais, kai reguliavimo reikmėms būtina patvirtinti odos jautrinimo potencialo neigiamą prognozę, pasirinktinai galima taikyti rLLNA protokolą (16) (17) (18), naudojant mažiau gyvūnų, jei laikomasi visų kitų LLNA protokolo specifikacijų pagal šį BM. Prieš taikant rLLNA metodą, turi būti pateikiamas jo taikymo aiškus pagrindimas ir mokslinis pagrindas. Jei gaunamas teigiamas arba dviprasmiškas rezultatas, gali pririnkti papildomų bandymų rezultatams išaiškinti arba patikslinti.

29. Vienintelis skirtumas tarp LLNA ir rLLNA bandymo metodų protokolų yra dozės grupių skaičiaus sumažinimas ir dėl šios priežasties rLLNA nesuteikia informacijos apie dozės ir atsako sąryšį. Todėl rLLNA neturi būti taikomas, kai reikalinga informacija apie dozės ir atsako sąryšį. Kaip ir kelių dozių LLNA, rLLNA metodu vertinama bandomosios medžiagos koncentracija turi būti didžiausia koncentracija, kuri pelėms nesukelia akivaizdaus sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo (žr. 18 skirsnį).

STEBĖJIMAI

Klinikiniai stebėjimai

30. Kiekviena pelė kruopščiai apžiūrinama bent kartą per dieną siekiant nustatyti bet kokius vietinio dirginimo užtepimo vietoje arba sisteminio toksiškumo klinikinius požymius. Visi pastebėjimai apie kiekvieną pelę yra sistemingai užrašomi. Į stebėsenos planus turi būti įtraukti kriterijai, pagal kuriuos galima tuoj pat nustatyti peles, kurioms pasireiškė sisteminis toksiškumas, per didelį vietinį odos dirginimą arba odos ėsdinimą, kad gyvūnus būtų galima numarinti (37).

Kūno masė

31. Kaip nurodyta 25 skirsnyje, atskirai kiekvieno gyvūno masė išmatuojama bandymo pradžioje ir humaniškai numarinant pagal planą.

REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

32. Kiekvienos poveikio grupės rezultatai išreiškiami kaip dirginimo rodiklis (angl., *Stimulation Index*, SI). Taikant atskirų gyvūnų metodą, SI gaunamas dalijant kiekvienos bandomosios medžiagos grupės vidutinę DPM / gyvūnui vertę ir PC grupės vidutinę DPM / gyvūnui vertę iš tirpiklio / VC grupės vidutinės DPM / gyvūnui vertės. Taigi, VC vidutinė SI vertė lygi 1. Taikant jungtinių poveikio grupių metodą, SI gaunamas bendrą visos poveikio grupės gautą radioaktyviųjų junginių patekimo dydį dalijant iš visai VC grupei gauto patekimo dydžio; šis dalmuo yra vidutinė SI vertė.
33. Vertinant rezultatus, atsakas laikomas teigiamu, jei $SI \geq 3$. Tačiau, sprendžiant, ar ribinis rezultatas turi būti paskelbtas teigiamu, galima atsižvelgti į dozės ir atsako sąryšio stiprumą, statistinį reikšmingumą ir tirpiklio / nešiklio bei PC atsakų nuoseklumą (4) (5) (6).
34. Jei gauti rezultatai nėra visiškai aiškūs, reikia atsižvelgti į įvairias bandomosios medžiagos savybes, įskaitant tai, ar jos struktūra gimininga žinomų odos jautriklių struktūrai, ar ji sukelia per didelį vietinį pelių odos dirginimą, ar pasireiškusio dozės ir atsako sąryšio tipą. Šie ir kiti aspektai yra išsamiai aptarti kitur (7).
35. Surenkant radioaktyvumo duomenis apie kiekvieną pelę galima statistiškai išanalizuoti dozės ir atsako sąryšį tuose duomenyse ir jo laipsnį. Atliekant bet kokį statistinį įvertinimą, galima įtraukti dozės ir atsako sąryšio vertinimą ir tinkamai pakoreguotus bandymo grupių palyginimus (pvz., suporuotų dozavimo grupių palyginimus su lygiagrečiomis VC). Į statistinę analizę gali būti įtraukta, pvz., tiesinė regresija arba Viljamso tyrimas, skirtas dozės ir atsako sąryšio tendencijoms įvertinti, ir suporuotų rezultatų palyginimų Daneto tyrimas. Rinkdamasis tinkamą statistinės analizės metodą tyrėjas turi turėti omenyje galimus variantiškumus ir kitas susijusias problemas, dėl kurių gali prireikti duomenų transformacijos ar neparimetrinės statistinės analizės. Bet kuriuo atveju tyrėjui gali tekti atlikti SI skaičiavimus ir statistinę analizę su tam tikrais duomenų taškais (kartais vadinamais „riktais“) ir be jų.

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Duomenys

36. Duomenys turi būti suvesti į lenteles. Kai taikomas atskirų gyvūnų metodas, pateikiamos atskirų gyvūnų DPM vertės, DPM/gyvūnui grupės vidurkis, atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM) ir kiekvienos dozės grupės vidutinis SI, palygintas su lygiagrečios VC grupės rodikliu. Kai taikomas jungtinių poveikio grupių metodas, pateikiama vidutinė DPM vertė / mediana ir kiekvienos dozės grupės vidutinis SI, palygintas su lygiagrečios VC grupės rodikliu.

Bandymo ataskaita

37. Bandymo ataskaitoje pateikiama ši informacija:

Bandomoji ir kontrolinė medžiagos:

- tapatumo duomenys (pvz., CAS ir EB numeriai, jei yra; šaltinis; grynumas; žinomos priemaišos; partijos numeris),
- fizikinė būseną ir fizikinės bei cheminės savybės (pvz., lakumas, stabilumas, tirpumas),

— jei tai mišinys – jo sudėtis ir komponentų procentinė dalis.

Tirpiklis / nešiklis:

- tapatumo duomenys (grynumas; koncentracija (jei tinka); naudojamas tūris),
- nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandymo gyvūnai:

- CBA pelių šaltinis;
- gyvūnų mikrobiologinė būsena, jei žinoma,
- gyvūnų skaičius ir amžius,
- gyvūnų šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.

Bandymo sąlygos:

- išsami informacija apie bandomosios medžiagos ruošimą ir užtepimą,
- dozės pasirinkimo pagrindimas (įskaitant atrankinio bandymo rezultatus, jei jis buvo daromas),
- naudotos nešiklio ir bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, suminis užteptos medžiagos kiekis,
- išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (įskaitant pašaro tipą ar šaltinį, vandens šaltinį),
- poveikio medžiaga ir mėginių ėmimo tvarkaraščiai,
- toksiškumo matavimo metodai,
- tyrimo rezultatų vertinimo kaip teigiami arba neigiami kriterijai,
- išsami informacija apie bet kokius nukrypimus nuo protokolo ir paaiškinimas, kaip tas nukrypimas paveikia tyrimo sistemą ir rezultatus.

Patikimumo tikrinimas:

- paskutinės patikimumo patikros rezultatų santrauka, įskaitant informaciją apie medžiagą, koncentraciją ir naudojamą nešiklį,
- bandymo laboratorijoje lygiagrečiai ir (arba) anksčiau sukaupti PC ir lygiagrečiai gauti NC duomenys,
- jei lygiagreti PC nebuvo naudojama, naujausio periodinio PC bandymo data ir laboratorijos ataskaita ir ataskaita su laboratorijos anksčiau sukauptais PC duomenimis, pagrindžiančiais lygiagrečios PC nenaudojimą.

Rezultatai:

- atskirų pelių masė dozės gavimo ir numatyto numarinimo dieną; taip pat kiekvienos poveikio grupės vidurkis ir atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM),
- toksinio poveikio atsiradimo laikas ir požymiai, įskaitant kiekvieno gyvūno odos dirginimą medžiagos užtepimo vietoje, jei yra,
- kiekvienos poveikio grupės atskiros pelės (atskirų gyvūnų metodas) DPM ir SI verčių arba vidurkių / medianų (jungtinių poveikio grupių metodas) lentelės,

- kiekvienos poveikio grupės DPM/pelei vidurkis ir atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM) ir kiekvienos poveikio grupės riktų analizės rezultatai, kai taikomas atskirų gyvūnų metodas,
- apskaičiuotas SI ir atitinkamas variantiškumo matas, kuriuo atsižvelgiama į atskirų gyvūnų rezultatų variantiškumą tiek bandomosios medžiagos, tiek kontrolinėje grupėse, kai taikomas atskirų gyvūnų metodas,
- dozės ir atsako sąryšis,
- statistinė analizė, jei taikoma.

Rezultatų aptarimas:

- trumpas rezultatų, dozės ir atsako sąryšio analizės ir statistinės analizės, jei taikoma, paaiškinimas, padarant išvadą, ar bandomoji medžiaga laikytina odą jautrinančia medžiaga.

NUORODOS

- (1) OECD (2002), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [<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. Available at: [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. Available at: [<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. Available at: [<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. Available at: [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. Available at: [<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 (NICEATM), NIH Publication No. 99–4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [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, Available at: [<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. Available at: [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. Available at: [<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. Available at: [<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, Available at: 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. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

1 priedelis

Naudojimo charakteristikų standartai, skirti įvertinti siūlomus panašius ar pakeistus LLNA bandymo metodus odos jautrinimui nustatyti

ĮVADAS

1. Naudojimo charakteristikų standartų (angl. *Performance Standards*, PS) paskirtis – pateikti pagrindą, kuriuo remiantis būtų galima nustatyti, ar nauji bandymo metodai, tiek patentuoti (t. y. saugomi autoriaus teisių, turintys prekės ženklą, registruoti), tiek nepatentuoti, pasižymi pakankamu tikslumu ir patikimumu konkrečioms bandymo tikslams. Šie PS, pagrįsti patvirtinto tinkamumo ir pripažintais bandymo metodais gali būti taikomi kitų panašių metodų (paprastai vadinamų „aš irgi“ (angl. *me-too*) bandymais), kurie grindžiami panašiais moksliniais principais ir kuriais matuojamas ar prognozuojamas tas pats biologinis ar toksinis poveikis, patikimumui ir tikslumui įvertinti (14).
2. Prieš naudojant modifikuotus metodus (t. y. pasiūlytus galimus patvirtino bandymo metodo patobulinimus), turi būti atliktas įvertinimas, skirtas nustatyti siūlomų pokyčių poveikį bandymo naudojimo charakteristikoms ir kaip smarkiai tokie pokyčiai paveiks turimą informaciją, skirtą kitiems tinkamumo patvirtinimo proceso komponentams. Atsižvelgiant į siūlomų pokyčių skaičių ir pobūdį, gautus duomenis ir tuos pakeičius remiančius dokumentus, modifikuotiems metodams taikomas toks pat tinkamumo patvirtinimo procesas kaip ir aprašytas naujam bandymui arba, jei tinka, ribotas patikimumo ir tinkamumo įvertinimas taikant nustatytus PS (14).
3. Panašūs ar modifikuoti metodai, siūloni taikyti pagal šį BM, turi būti įvertinti, kad būtų nustatytas jų patikimumas ir tikslumas, naudojant chemines medžiagas, kuriomis aprėpiamas visas LLNA įverčių intervalas. Siekiant išvengti nepageidaujamo gyvūnų naudojimo, griežtai rekomenduojama, kad modelių kūrėjai, prieš pradėdami tinkamumo patvirtinimo tyrimus pagal PS ir šiame BM pateiktas gaires, pasikonsultuotų su atitinkamomis institucijomis.
4. Šie PS pagrįsti US-ICCVAM, EC-ECVAM ir Japonijos JaCVAM suderintais PS (12), skirtais panašių ar modifikuotų LLNA versijų tinkamumui įvertinti. PS sudaro esminiai bandymo metodo komponentai, rekomenduojamos etaloniškos medžiagos ir tikslumo bei patikimumo standartai, kuriuos siūlomas metodas turi atitikti arba viršyti.

I. Esminiai bandymo metodo komponentai

5. Siekiant užtikrinti, kad panašus ar modifikuotas LLNA metodas būtų funkciškai ir mechanistiškai analogiškas LLNA ir jį taikant būtų išmatuojamas tas pats biologinis poveikis, į bandymo metodo protokolą įtraukiami šie komponentai:

- bandomoji medžiaga iš viršaus užtepama ant abiejų pelės ausų,
- limfocitų proliferacija matuojama bandomosios medžiagos poveikio vietą drenuojančiame limfmazgyje,
- limfocitų proliferacija matuojama odos jautrinimo indukcinio etapo metu,
- didžiausia parenkama bandomosios medžiagos dozė yra didžiausioji koncentracija, kuri pelėms nesukelia sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo. Didžiausia teigiamų rezultatų etaloninių cheminių medžiagų dozė turi būti ne mažesnė kaip atitinkamų etaloninių cheminių medžiagų LLNA EC3 vertės (žr. 1 lentelę), nesukeliant pelėms sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo,
- į kiekvieną tyrimą įtraukiama lygiavertė VC ir, jei tinka, lygiavertė PC,
- naudojami ne mažiau kaip keturi gyvūnai vienai dozės grupei,
- galima rinkti atskirų gyvūnų arba jungtinių gyvūnų grupių duomenis.

Jei kurių nors kriterijų nesilaikoma, šie PS negali būti taikomi panašaus ar modifikuoto metodo tinkamumui patvirtinti.

II. Minimalus etaloninių cheminių medžiagų sąrašas

6. US-ICCVAM, EC-ECVAM ir Japonijos JaCVAM suderintuose PS (12) nustatyta 18 būtinųjų etaloninių cheminių medžiagų, kurios turi būti naudojamos, ir keturios pasirinktinės etaloninės medžiagos (t. y. medžiagos, su kurios atliekant LLNA buvo gauti klaidingi teigiami arba klaidingi neigiami rezultatai, palyginti su bandymų su žmonėmis ar jūrų kiaulytėmis rezultatais (B.6 arba OECD bandymų metodika 406) (13), ir todėl jos suteikia galimybę įrodyti LLNA lygiavertes ar geresnes naudojimo charakteristikas), įtrauktos į LLNA PS. Šių cheminių medžiagų nustatymo kriterijai:

- į etaloninių cheminių medžiagų sąrašą buvo įtrauktos tų tipų medžiagos, kurių odos jautrinimo potencialas ir atsakų, kuriuos galima išmatuoti ar numatyti LLNA, intervalas paprastai būdavo bandomas,
- medžiagos yra aiškiai apibrėžtos cheminės struktūros,
- apie kiekvieną medžiagą turėta LLNA duomenų iš bandymų su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (13) ir (kai įmanoma) iš žmonių, ir
- medžiagas lengva gauti iš komercinių šaltinių.

Rekomenduojamos etaloninės cheminės medžiagos išvardytos 1 lentelėje. Tyrimuose, kuriuose naudojamos siūlomos etaloninės cheminės medžiagos, turi būti naudojami nešikliai, su kuriais jos išvardytos 1 lentelėje. Tais atvejais, kai nurodytos medžiagos negalima gauti, pateikus pakankamą pagrindimą, galima naudoti kitas medžiagas, kurios atitinka išvardytus atrankos kriterijus.

LLNA PS rekomenduojamos etaloninės cheminės medžiagos

Nr.	Cheminės medžiagos ⁽¹⁾	CAS Nr.	Pavidalas	Neš. ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5x - 2,0x EC3	Tikrasis EC3 intervalas	LLNA vs. GP	LLNA vs. žmonės
1	5-chlor-2-metil-4-izotiazolin-3-onas (CMI)/2-metil-4-izotiazolin-3-onas (MI) ⁽⁵⁾	26172-55-4/2682-20-4	SKK.	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NA	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Kiet.	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-fenilenediaminas	106-50-3	Kiet.	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Kobalto chloridas	7646-79-9	Kiet.	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Izoeugenolis	97-54-1	SKK.	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptobenzotiazolas	149-30-4	Kiet.	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NA	+/+	+/+
7	Citralas	5392-40-5	SKK.	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	SKK.	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenolis	97-53-0	SKK.	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Fenilo benzoatas	93-99-2	Kiet.	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Cinamilo alkoholis (stirolis)	104-54-1	Kiet.	AOO	21	1	10,5-42	NA	+/+	+/+
12	Imidazolidinilo šlapalas	39236-46-9	Kiet.	DMF	24	1	12-48	NA	+/+	+/+
13	Metilo metakrilatas	80-62-6	SKK.	AOO	90	1	45-100	NA	+/+	+/+
14	Chlorobenzenas	108-90-7	SKK.	AOO	25	1	NT	NT	-/-	-/ (*)
15	Izopropanolis	67-63-0	SKK.	AOO	50	1	NT	NT	-/-	-/+
16	Pieno rūgštis	50-21-5	SKK.	DMSO	25	1	NT	NT	-/-	-/ (*)
17	Metilo salicilatas	119-36-8	SKK.	AOO	20	9	NT	NT	-/-	-/-
18	Salicilo rūgštis	69-72-7	Kiet.	AOO	25	1	NT	NT	-/-	-/-

Nr.	Cheminės medžiagos ⁽¹⁾	CAS Nr.	Pavidalas	Neš. ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5x - 2,0x EC3	Tikrasis EC3 intervalas	LLNA vs. GP	LLNA vs. žmonės
Pasirinktines medžiagas, skirtos geresnems naudojimo charakteristikoms, palyginti su LLNA, įrodyti										
19	Natrio laurilo sulfatas	151–21–3	Kiet.	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1,5–17,1	+/-	+/-
20	Etilenglikolio dimetakrilatas	97–90–5	SKK.	MEK	28	1	14–56	NA	+/-	+/+
21	Ksilolas	1330–20–7	SKK.	AOO	95,8	1	47,9–100	NA	+/ ^(**)	+/-
22	Nikelio chloridas	7718–54–9	Kiet.	DMSO	5	2	NT	NT	-/+	-/+

Santrumpos: AOO = acetono ir alyvų aliejaus mišinys (4:1, tūrio dalys); CAS Nr. = Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos numeris; DMF = N,N-dimetilformamidas; DMSO = dimetilsulfoksidas; DNCB = 2,4-dinitrochlorbenzenas; EC3 = numatyta koncentracija, reikalinga dirginimo rodikliui 3 pasiekti; GP = bandymo su jūrų kiaulytėmis rezultatas (t. y. B. 6 arba OECD bandymų metodika 406) (13); HCA = heksilcinamono aldehidai; SKK. = skystis; LLNA = pelių Vietinio limfmazgio bandymo rezultatas (t. y. B. 42 arba OECD bandymų metodika 429) (1); MEK = metiletilketonas; NT = netaikoma, nes dirginimo rodiklis < 3; NA = neapskaičiuota, nes duomenys gauti iš vieno tyrimo; Kiet. = kietoji medžiaga; Neš. = bandymo nešiklis.

(*) Laikoma, kad tai nėra jautrinanti medžiaga žmonėms, remiantis tuo, kad nėra gauta jokių klinikinių odos lopo mėginio rezultatų, jos nėra tarp odos lopo bandymų rinkinio alergenų ir nėra gauta pranešimų apie žmonių jautrinimą.

(**) GP duomenų neturima/.

(1) Cheminės medžiagos paruošiamos kasdien, nebent stabilumo duomenys rodo, kad jas galima laikyti ilgesnį laiką.

(2) Dėl galimo skirtingų nešiklių poveikio LLNA naudojimo charakteristikoms, turi būti naudojamas kiekvienai etaloninei cheminei medžiagai rekomenduojamas nešiklis (24)(32).

(3) Vidutinė vertė, jei turima daugiau kaip viena EC3 vertė. Neigiamo rezultato medžiagoms (t. y. kurių dirginimo rodiklis < 3), pateikta didžiausia išbandyta koncentracija.

(4) LLNA tyrimų, kurių duomenys gauti, skaičius.

(5) Prekyboje žinomas kaip „Kathon CG“ (CAS Nr. 55965–84–9), kuris yra CMI ir MI mišinys santykiu 3:1. Kiekvieno komponento santykinės koncentracijos įvairuoja nuo 1,1 % iki 1,25 % (CMI) ir nuo 0,3 % iki 0,45 % (MI). Neaktyviosios medžiagos yra magnio druskos (nuo 21,5 % iki 24 %) ir vario nitratas (nuo 0,15 % iki 0,17 %), o likusią preparato dalį sudaro vanduo (nuo 74 % iki 77 %). „Kathon CG“ tiekia „Sigma-Aldrich“ ir „Rohm and Haas“ (dabar – „Dow Chemical Corporation“).

III. Nustatyti patikimumo ir tikslumo standartai

7. Panašaus arba modifikuoto LLNA metodo tikslumas turi būti toks pat kaip LLNA PS arba jį viršyti; vertinama naudojant 18 būtinųjų etaloninių cheminių medžiagų, kurios turi būti naudojamos. Taikant naują arba modifikuotą metodą turi būti teisingai klasifikuojama, pagal sprendimą „taip“ arba „ne“. Vis dėlto, taikant naują arba modifikuotą metodą gali būti tiksliai klasifikuojamos ne visos iš būtinųjų etaloninių cheminių medžiagų, kurios turi būti naudojamos. Jei, pvz., vienas iš silpnų jautriklų klasifikuojamas neteisingai, galima būtų atsižvelgti į neteisingo klasifikavimo loginį pagrindą ir atitinkamus papildomus duomenis (pvz., bandymo rezultatus, pagal kuriuos teisingai klasifikuojamos kitos medžiagos, kurių fizinės, cheminės ir jautrinančiosios savybės yra panašios į neteisingai klasifikuotos cheminės medžiagos savybes), kad būtų įrodytos lygiavertės naudojimo charakteristikos. Tokiais atvejais naujo ar modifikuoto LLNA bandymo metodo tinkamumo patvirtinimo išvada būtų vertinama kiekvienu konkrečiu atveju.

Atkuriamumas laboratorijoje

8. Siekiant nustatyti atkuriamumą laboratorijoje, naujas arba modifikuotas LLNA metodas įvertinamas naudojant jautrinančią medžiagą, kuri tinkamai apibūdinama taikant LLNA. Todėl LLNA PS grindžiami heksilcinamono aldehido (HCA) kartotinių bandymų rezultatų variantiškumu. Siekiant įvertinti variantiškumą laboratorijoje, keturiais atskirais bandymais, tarp kurių turi praeiti ne mažiau kaip savaitė, gaunamos numatytosios slenkstinės koncentracijos (angl. *threshold estimated concentration*, ECt) vertės. Priimtinas atkuriamumas laboratorijoje nusakomas laboratorijos gebėjimu, atliekant kiekvieną HCA bandymą, gauti ECt vertes nuo 5 % ir 20 %, kas atitinka 0,5–2,0 kartų vidutinės EC3 vertės, nustatytos HCA (10 %), taikant LLNA (žr. 1 lentelę), intervalą.

Atkuriamumas tarp laboratorijų

9. Naujo arba modifikuoto LLNA metodo atkuriamumas tarp laboratorijų įvertinamas naudojant dvi jautrinančias medžiagas, kurios tinkamai apibūdinamos taikant LLNA. LLNA PS grindžiami skirtingose laboratorijose atliktų HCA ir 2,4-dinitrochlorbenzeno (DNCB) bandymų rezultatų variantiškumu. ECt vertės turi būti gautos nepriklausomai, vienu tyrimu, atliktu ne mažiau kaip trijose skirtingose laboratorijose. Norint įrodyti priimtina atkuriamumą tarp laboratorijų, kiekviena laboratorija turi gauti HCA ECt vertes nuo 5 % iki 20 % ir DNCB vertes nuo 0,025 % iki 0,1 %, kas atitinka 0,5–2,0 kartų vidutinės EC3 vertės, nustatytos atitinkamai HCA (10 %) ir DNCB (0,05 %), taikant LLNA (žr. 1 lentelę), intervalą.

2 priedėlis

Apibrėžtys

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių artumas. Tikslumas yra bandymo metodo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (14).

Palyginamoji medžiaga – jautrinanti arba nejautrinanti medžiaga, naudojama kaip bandomosios medžiagos palyginimo standartas. Palyginamoji medžiaga turi pasižymėti tokiomis savybėmis: i) pastoviu (-iais) ir patikimu (-ais) šaltiniu (-iais), ii) struktūriniu ir funkciniu panašumu į bandomų medžiagų klasę, iii) žinomomis fizikinėmis ir cheminėmis charakteristikomis, iv) patvirtinančiais duomenimis apie žinomus poveikius ir v) žinomu potencialu norimų atsakų intervale.

Numatytasis koncentracijos slenkstis (ECt) – numatyta bandomosios medžiagos koncentracija, reikalinga, kad būtų pasiektas dirginimo rodiklis, rodantis teigiamą atsaką.

Numatytoji koncentracija Nr. 3 (EC3) – numatyta bandomosios medžiagos koncentracija, reikalinga, kad būtų pasiektas dirginimo rodiklis, lygus trims.

Klaidingai neigiamas rezultatas – bandymo metodu bandomoji medžiaga neteisingai įvertinta kaip neigiama arba neaktyvi, nors iš tiesų yra teigiama arba aktyvi.

Klaidingai teigiamas rezultatas – bandymu bandomoji medžiaga neteisingai įvertinta kaip teigiama arba aktyvi, nors iš tiesų yra neigiama arba neaktyvi.

Pavojus – neigiamo poveikio sveikatai arba ekologijai galimybė. Neigiamas poveikis pasireiškia tik tada, jei veikimas medžiaga yra pakankamo lygio.

Atkuriamumas tarp laboratorijų – laipsnio, kuriuo skirtingos kvalifikuotos laboratorijos, taikydamos tą patį protokolą ir bandančios tas pačias bandomąsias medžiagas, gali gauti kokybiškai ir kiekybiškai panašius rezultatus, matas. Atkuriamumas tarp laboratorijų nustatomas atliekant pradinio tinkamumo patvirtinimo ir tinkamumo pavirtinimo procesus ir rodo laipsnį, kuriuo bandymą galima sėkmingai perkelti tarp laboratorijų; tai dar vadinama tarp laboratorinių atkuriamumu (14).

Atkuriamumas laboratorijoje – laipsnio, kuriuo kvalifikuoti darbuotojai toje pačioje laboratorijoje gali sėkmingai atkartoti rezultatus, taikydami konkretų protokolą skirtingu metu, matas. Dar vadinamas laboratoriniu atkuriamumu (14).

„Aš irgi“ (angl. *me-too*) bandymas – šnekamosios kalbos pasakymas, kuriuo vadinamas bandymo metodas, struktūriškai ir funkciškai panašus į patvirtinto tinkamumo ir pripažintą pamatinį bandymo metodą. Toks bandymo metodas gali būti taikomas palyginamajam tinkamumo patvirtinimui. Taikomas pakaičiui su panašiu bandymo metodu (14).

Riktas – pastebėjimas, kad vertė labai skiriasi nuo kitų atsitiktinio populiacijos ėminio verčių.

Naudojimo charakteristikų standartai (angl. *PS*) – standartai, pagrįsti patvirtinto tinkamumo bandymo metodu, sudarantys pagrindą įvertinti siūlomo funkciškai ir mechanistiškai panašaus bandymo metodo palyginamumą. Įtraukiami šie dalykai: i) esminiai bandymo metodo komponentai, ii) būtinas sąrašas etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš tų medžiagų, kurios naudojamos patvirtinto tinkamumo bandymo metodo priimtoms naudojimo charakteristikoms įrodyti, ir iii) panašus tikslumo ir patikimumo lygis, atsižvelgiant į pasiekiamą patvirtinto tinkamumo bandymo metodu, kurį siūlomas bandymo metodas turi turėti vertinamas pagal būtiną etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (14).

Patentuotas bandymo metodas – bandymo metodas, su kuriuo susijusi gamyba ir platinimas yra ribojami patentais, autoriaus teisėmis, prekės ženklais ir kt.

Kokybės užtikrinimas – valdymo procesas, per kurį asmenys, nepriklausomi nuo atliekančiųjų bandymus, įvertina, kaip laboratorija laikosi bandymo standartų, reikalavimų ir užrašų saugojimo procedūrų bei duomenų perdavimo tikslumo.

Etalonišės cheminės medžiagos – cheminės medžiagos, kurios yra pasirinktos naudoti tinkamumo patvirtinimo procese ir kurių atveju atsakas *in vitro* arba *in vivo* etalonišėje bandymo sistemoje arba dominančių rūšių atsakas jau žinomas. Šios cheminės medžiagos turi būti tipinės cheminių medžiagų klasėms, kurioms numatyta taikyti bandymo metodą, ir turi perteikti visus atsakus, kurių tikimasi iš cheminių medžiagų, kurioms gali būti taikomas metodas – tiek stiprius, tiek silpnus, tiek neigiamus. Skirtingais tinkamumo patvirtinimo proceso etapais ir skirtingiems bandymo metodams bei paskirtims gali prireikti skirtingų etaloninių cheminių medžiagų rinkinių (14).

Tinkamumas – bandymo ir dominančio poveikio sąryšio ir bandymo prasmingumo bei naudingumo konkrečiam tikslui apibūdinimas. Tai yra matas, kiek tiksliai bandymu išmatuojamas ar numanomas dominantis biologinis poveikis. Tinkamumas apima bandymo metodo tikslumo (sutapimo) aspektą (14).

Patikimumas – juo įvertinamas laipsnis, kuriuo bandymo metodas gali būti ilgainiui atkartojamai atliekamas vienoje ir skirtingose laboratorijose, taikant tą patį protokolą. Jis įvertinamas skaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (14).

Odos jautrinimas – imunologinis procesas, vykstantis paveiktų individų išoriškai paveikus cheminiu alergenu, kuris sukelia odos imuninį atsaką, dėl kurio gali atsirasti kontaktinis jautrinimas.

Dirginimo rodiklis (angl. *SI*) – vertė, apskaičiuojama bandomosios medžiagos jautrinimo potencialui įvertinti – tai yra paveiktų grupių proliferacijos sąryšio su lygiagrečios nesiklio kontrolinės grupės proliferacija koeficientas.

Bandomoji medžiaga (dar vadinama bandomąja chemine medžiaga) – bet kuri medžiaga ar mišinys, bandomi taikant šį bandymų metodą.

Patvirtinto tinkamumo bandymo metodas – bandymo metodas, kurio tinkamumo patvirtinimo tyrimai atlikti, nustatant tinkamumą (įskaitant tikslumą) ir patikimumą konkrečiam tikslui. Svarbu pažymėti, kad patvirtinto tinkamumo bandymo metodas gali būti nepakankamų naudojimo charakteristikų tikslumo ir patikimumo prasme, kad būtų pripažintas tinkamu siūlomam tikslui (14).“

2. B.46 skyrius keičiamas taip:

„B.46. IN VITRO ODOS DIRGINIMAS. REKONSTRUOTO ŽMOGAUS EPIDERMIO BANDYMO METODAS

ĮVADAS

1. Odos dirginimu vadinama grįžtamoji odos pažeida po bandomosios medžiagos užtepimo ne ilgiau kaip 4 valandoms [kaip apibrėžta Jungtinių Tautų (JT) visuotinai suderintoje cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklinimo sistemoje (angl. *GHS*)] ir 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamente (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo (KŽP) (1)(3)]. Šis bandymo metodas (BM) apima *in vitro* procedūrą, pagal kurią galima nustatyti dirginančiųjų cheminių medžiagų (ir mišinių) pavojų pagal JT *GHS* ir ES KŽP 2-ąją kategoriją (1) (2) (3). ES ir kituose regionuose, kuriuose netaikoma papildomoji JT *GHS* 3-ioji kategorija (švelnūs dirgikliai), šis BM taip pat gali būti taikomas neklasifikuojamoms cheminėms medžiagoms, t. y. priskirtoms JT *GHS* ir ES KŽP grupei „nera kategorijos“, identifikuoti (1)(3). Šis BM gali būti taikomas cheminių medžiagų galimybei dirginti odą nustatyti, kaip atskiras pakaitinis bandymas, skirtas *in vivo* odos dirginimui bandyti pagal nuosekliųjų bandymų strategiją (4 ir šio priedo B.4 skyrius).

2. Odos dirginimas paprastai buvo vertinamas naudojant laboratorinius gyvūnus [OECD bandymų metodika 404; šio priedo B.4 skyrius](4). Rūpinantis gyvūnų gerove, B.4 metodu (pakeistu 2004 m.) galima nustatyti esdinamąjį ar dirginamąjį poveikį odai pagal nuosekliųjų bandymų strategiją, taikant patvirtinto tinkamumo *in vitro* ir *ex vivo* metodus ir taip apsaugant gyvūnus nuo skausmo ir kančių. Nuosekliosios bandymų strategijos B.4 arba OECD bandymų metodikos 404 (4) esdinimo bandymams tinka trys patvirtinto tinkamumo *in vitro* bandymų metodai, priimti kaip OECD bandymų metodikos 430, 431 bei 435 (5) (6) (7), o du iš jų – kaip šio priedo B.40 ir B.40a skyriai.
3. Šis BM skirtas odos dirginimui pagal žmogaus sveikatos įvertį. Jis pagrįstas rekonstruoto žmogaus epidermio (angl. *reconstructed human epidermis*, RhE) modeliu, kurio bendroji schema (kaip ląstelių šaltinis naudojami žmogaus epidermio keratinocitai, reprezentatyvusis audinys ir citoarchitektonika) labai artima žmogaus odos paviršinio sluoksnio, t. y. epidermio biocheminėms ir fiziologinėms savybėms. Be to, į šį BM įtrauktas naudojimo charakteristikų standartų (angl. PS) rinkinys (2 priedėlis), skirtas įvertinti panašius ir modifikuotus RhE pagrįstus bandymo metodus, kuriuos EC-ECVAM (8) parengė pagal OECD metodikos dokumentą Nr. 34 (9).
4. Yra trys patvirtinto tinkamumo metodai, atitinkantys šį BM. Buvo atlikti dviejų *in vitro* bandymo metodų (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), kurių komercinis pavadinimas „EpiSkin™“ (patvirtinto tinkamumo pamatinis metodas, angl. *Validated Reference Method*, VRM), pradinio tinkamumo patvirtinimo, optimizavimo ir tinkamumo patvirtinimo tyrimai, naudojant RhE modelį. Remiantis PS pagrįstų tinkamumo patvirtinimu (21), dviejų kitų komercinių *in vitro* odos dirginimo RhE metodų rezultatai yra panašūs VRM: „EpiDerm™“ SIT (EPI-200) ir „SkinEthic™“ RHE metodai (22).
5. Prieš taikant siūlomą panašų arba modifikuotą *in vitro* RhE metodą, kuris nėra VRM, „EpiDerm™“ SIT (EPI-200) arba „SkinEthic™“ RHE, reglamentavimo tikslais reikia nustatyti jo patikimumą, tinkamumą (tikslumą) ir siūlomo naudojimo apribojimus, siekiant užtikrinti jo panašumą į VRM, pagal šiame BM nustatytus PS (2 priedėlis) Be to, prieš kuriant panašų ar modifikuotą *in vitro* RhE metodą, tvirtinant jo tinkamumą ir pateikiant oficialiai patvirtinti, rekomenduojama laikytis OECD aiškinamojo pagrindų dokumento, skirto *in vitro* odos dirginimo bandymams (23).

APIBRĖŽTYS

6. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

7. Šio BM apribojimas, kurį rodo tinkamumo patvirtinimo tyrimas (16), yra tai, kad pagal jį cheminių medžiagų negalima priskirti papildomai JT GHS 3-iajai kategorijai (švelnūs dirgikliai) (1). Kai taikomas kaip dalinis pakaitinis bandymas, gali prireikti paskesnio *in vivo* bandymo, kad būtų visiškai apibūdinamas odos dirginimo potencialas (4 ir šio priedo B.4 skyrius). Pripažįstama, kad žmogaus odos bandymams taikomi nacionaliniai ir tarptautiniai etikos principai ir sąlygos.
8. Šis BM skirtas odos korozijos/dirginimo nuosekliųjų bandymų strategijos B.4 (OECD bandymų metodika 404) *in vitro* odos dirginimo komponentui (4). Nors taikant šį BM negaunama pakankamos informacijos apie odos koroziją, reikia pažymėti, kad odos korozijai skirtas B.40a (OECD bandymų metodika 431) yra pagrįstas ta pačia RhE bandymo sistema, tačiau taikomas kitas protokolas (B.40a skyrius). Šis metodas pagrįstas RhE modeliais, pagal kuriuos naudojami žmogaus keratinocitai, kurie dėl to *in vitro* atitinka dominančios rūšies tikslinį organą. Be to, jis tiesiogiai apima pradinį veikiančios uždegiminės kaskados / mechanizmo (ląstelės ir audinio pažeidimą, dėl kurio patiriama vietinė trauma) etapą, įvykstantį dirginant *in vivo*. Atliekant šiam BM skirtą tinkamumo patvirtinimą buvo išbandyta daug cheminių medžiagų ir į empirinę tinkamumo patvirtinimo tyrimo duomenų bazę iš viso įtrauktos 58 cheminės medžiagos (16) (18) (23). Tai yra kietosios medžiagos, skysčiai, pusiau kietosios medžiagos ir vašikai. Skysčiai gali būti vandeniniai ir nevandeniniai; kietosios medžiagos gali būti tirpios ir netirpios vandenyje. Kai įmanoma, kietosios medžiagos prieš užtepimą sumalamos iki smulkių miltelių; niekaip kitaip mėginio apdoroti nereikia. Dujos ir purškalai tinkamumo patvirtinimo tyrimu kol kas įvertinti nebuvo (24). Nors šias medžiagas įmanoma bandyti pagal RhE metodiką, pagal šį BM dujų ir purškalo bandyti negalima. Taip pat reikia pažymėti, kad labai spalvingos cheminės medžiagos gali trukdyti atlikti ląstelių gyvybingumo matavimus ir pataisoms būtina naudoti pritaikytas kontrolines medžiagas (žr. 24–26 skirsnius).
9. Jei klasifikacija neabejotina, bandomajai cheminei medžiagai turi pakakti vienos bandymų serijos su trimis kartotiniaus audiniais. Tačiau, jei rezultatai ribiniai, pvz., kartotinių matavimų rezultatai nesutampa ir (arba) vidutinė procentinė gyvybingumo vertė lygi $50 \pm 5\%$, turi būti apsvaistoma, ar nereikia antrosios serijos ir trečiosios, jei pirmųjų dviejų serijų rezultatai išsiskirtų.

BANDYMO PRINCIPAS

10. Bandomoji cheminė medžiaga užtepama ant trimačio RhE modelio, sudaryto iš normalių žmogaus odos keratinocitų, kurie buvo kultivuojami, kad galėtų būti gautas daugiasluoksnis labai gerai diferencijuotas žmogaus epidermio modelis. Jį sudaro suformuoti pamatinis, dygliuotasis ir grūdėtasis sluoksniai ir daugiasluoksnis *stratum corneum*, turintis tarpląstelių žvynelių pavidalo lipidų sluoksnį, kurių struktūra yra analogiška *in vivo* nustatyti struktūrai.

11. Cheminių medžiagų sukeltas odos dirginimas, pasireiškiantis eritema ir edema, yra įvykių kaskados, prasidedančios prasiskverbimu pro *stratum corneum* ir po juo esančių keratinocitų sluoksnių pažeidimu, padarinys. Žūvantys keratinocitai išleidžia mediatorius, kurie pradeda uždegiminę kaskadą, veikiančią *dermis* ląsteles, pirmiausia stromos ir endotelio ląsteles. Matomą eritemą ir edemą sukelia būtent endotelio ląstelių išsiplėtimas ir padidėjęs pralaidumas (24). RhE grindžiamais metodais matuojami kaskadą sukeltantys įvykiai.
12. Ląstelių gyvybingumas RhE modeliuose matuojamas pagal gyvybinio dažiklio MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido (tiazolilio mėlio), CAS Nr. 298-93-1, fermentinę konversiją į mėlyną formazano druską, kurios kiekis išmatuojamas išskyrus iš audinių (25). Dirginančios cheminės medžiagos identifikuojamos pagal jų gebą sumažinti ląstelių gyvybingumą iki mažesnio nei nustatyto slenkstinio lygio (t. y. $\leq 50\%$ JT GHS/ES KŽP 2-ajai kategorijai). Atsižvelgiant į reglamentavimo sistemą, kurioje naudojami šio BM rezultatai, cheminės medžiagos, po kurių poveikio ląstelių gyvybingumas viršija nustatytą slenkstinį lygį, gali būti laikomos nedirginančiomis (t. y. $> 50\%$, „nėra kategorijos“).

KVALIFIKACIJOS ĮRODYMAS

13. Prieš pradėdamos įprastu būdu taikyti bet kuri iš trijų patvirtinto tinkamumo metodų, kurie atitinka šį BM, laboratorijos turi įrodyti techninę kvalifikaciją, naudodamos dešimt etalonių cheminių medžiagų, išvardytų 1 lentelėje. Taikant panašius metodus, parengtus pagal šį BM, arba pakeitus bet kuri iš trijų patvirtinto tinkamumo metodų, turi būti laikomasi šio BM 2 priedėlyje aprašytų PS reikalavimų, kad metodas galėtų būti taikomas reglamentuojamiems bandymams.
14. Rekomenduojama, kad, įrodydamas kvalifikaciją, naudotojas patikrintų gautų audinių apsaugines savybes, nurodytas RhE modelio gamintojo. Tai ypač svarbu, jei audiniai vežami ilgus nuotolius ar laiko tarpą. Kai metodas sėkmingai patvirtintas ir įrodyta jo taikymo kvalifikacija, vėliau tokio tikrinimo pastoviai daryti nebūtina. Tačiau, jei metodas taikomas pastoviai, rekomenduojama ir toliau reguliariai vertinti audinių apsaugines savybes.

1 lentelė

Etalonišės cheminės medžiagos ⁽¹⁾

Cheminės medžiaga	CAS Nr.	<i>In vivo</i> įvertis ⁽²⁾	Fizikinė būseną	JT GHS/ES KŽP kategorija
naftalenacto rūgštis	86-87-3	0	Kieta m.	Be kat.
izopropanolis	67-63-0	0,3	Skystis	Be kat.
metilstearatas	112-61-8	1	Kieta m.	Be kat.
heptilbutiratas	5877-93-9	1,7	Skystis	Be kat. (3-ioji papildomoji kategorija) ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾
heksilsalicilatas	6255-76-3	2	Skystis	Be kat. (3-ioji papildomoji kategorija) ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾
ciklamanaldehidą	103-95-7	2,3	Skystis	2 kat.
1-bromheksanas	111-25-1	2,7	Skystis	2 kat.
kalio hidroksidas (5 % vand.)	1311-58-3	3	Skystis	2 kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazinas	5277-27-2	3,3	Kieta m.	2 kat.
Heptanalis	111-71-7	3,4	Skystis	2 kat.

⁽¹⁾ Šios etalonišės cheminės medžiagos yra tinkamumo patvirtinimo tyrime naudojamų etalonių cheminių medžiagų poaibis.

⁽²⁾ *In vivo* įvertis pagal B.4 ir OECD bandymų metodiką 404 (4).

⁽³⁾ Pagal šią bandymo metodą, JT GHS 3-ioji papildomoji kategorija (švelnūs dirgikliai) (1) prilyginama „nėra kategorijos“.

⁽⁴⁾ JT GHS 3-ioji papildomoji kategorija netaikoma pagal ES KŽP.

BANDYMO EIGA

15. Toliau aprašomi odos dirginimui įvertinti naudojamo RhE metodo komponentai ir procedūros. RhE modelis gali būti atkurta, paruoštas vietoje arba išsigytas. Galimos standartinės taikymo procedūros (angl. *Standard Operating Procedures*, SOP): „EpiSkin™“, „EpiDerm™ SIT (EPI-200)“ ir „SkinEthic™ RHE“ (26) (27) (28). Bandymai turi būti atliekami kaip nurodyta toliau:

RhE Bandyto Metodo Komponentai*Bendrosios sąlygos*

16. Epiteliui atkurti turi būti naudojami normalūs žmogaus odos keratinocitai. Po funkcinio *stratum corneum* turi būti keli gyvybingų epitelio ląstelių sluoksniai (pamatinis sluoksnis, dygliuotasis (*stratum spinosum*), grūdėtasis (*stratum granulosum*)). *Stratum corneum* turi būti daugiasluoksnis ir turėti pagrindinius lipidų sluoksnius, kad būtų gautas patvarus funkcinis barjeras, kuris būtų atsparus cheminių citotoksinių žymeklių, pvz., natrio dodecilsulfato (SDS) arba „Triton X-100“, greitam prasiskverbimui. Apsauginė funkcija gali būti įvertinta nustatant koncentraciją, kuriai esant cheminis žymeklis, praėjus nustatytam poveikio laikui, sumažina audinių gyvybingumą 50 % (IC₅₀) arba nustatant tam tikros pastovios koncentracijos cheminio žymeklio poveikio trukmę, per kurią ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (ET₅₀). Modelis turi turėti sulaikymo savybes, kurios apsaugotų nuo medžiagos patekimo į gyvąjį audinį apeinant *stratum corneum*, dėl ko būtų blogai modeliuojamas odos veikimas medžiaga. RhE modelis turi būti neužterštas bakterijomis, virusais, mikoplazma ar grybeliais.

*Funkcinės sąlygos**Gyvybingumas*

17. Gyvybingumo dydžiui nustatyti taikomas MTT bandymas (25). Naudojantieji RhE modelį turi užtikrinti, kad kiekviena RhE modelio partija atitiktų apibrėžtus neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos (angl. NC) kriterijus. Paties ekstrahavimo tirpalo optinis tankis (angl. *optical density*, OD) turi būti pakankamai mažas, t. y. OD < 0,1. Neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos OD verčių (odos dirginimo bandymo metodo sąlygomis) priimtino intervalo (viršutinę ir apatinę ribas) nustato hE modelio gamintojas/tiekėjas, o 3-ų patvirtinto tinkamumo metodų priimtino intervalo nurodyti 2 lentelėje. Reikia patvirtinti dokumentais, kad NC paveiktas audinys yra stabilus kultūroje (gaunami panašūs gyvybingumo matavimo rezultatai) visą veikimo medžiaga laikotarpį.

2 lentelė

Neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos OD verčių priimtino intervalo

	Apatinė priimtino riba	Viršutinė priimtino riba
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Apsauginė funkcija

18. *Stratum corneum* ir jo lipidų sudėtis turi būti pakankama, kad jie būtų atsparūs greitam cheminių citotoksinių žymeklių, pvz., SDS arba Triton X-100, prasiskverbimui, įvertintam matuojant IC₅₀ arba ET₅₀ (3 lentelė).

Morfologija

19. Turi būti atliktas RhE modelio histologinis tyrimas, siekiant įrodyti, kad ji turi į žmogaus *epidermį* panašią struktūrą (įskaitant daugiasluoksnį *stratum corneum*).

Atkuriamumas

20. Reikia įrodyti bandymo metodo rezultatų, gautų naudojant teigiamo poveikio kontrolinę cheminę medžiagą (PC) ir neigiamo poveikio kontrolines medžiagas (NC), ilgalaikį atkuriamumą.

Kokybės kontrolė (angl. *quality control*, QC)

21. RhE modelio gamintojas/tiekėjas turi užtikrinti ir įrodyti, kad kiekviena naudojama RhE modelio partija atitinka nustatytus produkcijos išleidimo kriterijus, iš kurių svarbiausi yra *gyvybingumo* (17), *apsauginės funkcijos* (18 skirsnis) ir *morfologijos* (19 skirsnis) kriterijai. Šie duomenys turi būti pateikti taikantiesiems metodą, kad jie galėtų įtraukti šią informaciją į bandymo ataskaitą. IC₅₀ arba ET₅₀ priimtino intervalą (viršutinę ir apatinę ribas) turi nustatyti RhE modelio gamintojas/tiekėjas (arba tyrėjas, kai naudojamas vietinis modelis). Tik su kokybiškais audiniais gauti rezultatai gali būti laikomi patikimais prognozuojant dirginimo klasifikaciją. 3 lentelėje pateikti patvirtinto tinkamumo trijų metodų priimtino intervalų pavyzdžiai.

3 lentelė

QC partijos išleidimo kriterijų pavyzdžiai

	Apatinė priimtino riba	Viršutinė priimtino riba
EpiSkin™ (SM) (18 valandų apdorojimas naudojant SDS)(26)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % „Triton X-100“)(27)	ET ₅₀ = 4,8 val.	ET ₅₀ = 8,7 val.
SkinEthic™ RHE (1 % „Triton X-100“)(28)	ET ₅₀ = 4,0 val.	ET ₅₀ = 9,0 val.

Bandomosios ir kontrolinės cheminių medžiagų užtepimas

22. Kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai ir kontrolinei medžiagai kiekvienoje bandymo serijoje turi būti naudojami bent trys kartotiniai bandiniai. Tiriant skystąsias ir kietąsias medžiagas, naudojamos bandomosios cheminės medžiagos kiekis turi būti pakankamas, kad *epidermio* paviršius būtų tolygiai padengtas medžiaga, bet vengiama neribotos dozės, t. y. naudotinas minimalus kiekis turi būti 25 µl/cm² arba 25 mg/cm². Jei bandomos kietosios medžiagos, prieš jų užtepimą *epidermio* paviršių reikia suvilgyti dejonizuotu arba distiliuotu vandeniu, kad būtų užtikrintas geras bandomosios cheminės medžiagos sąlytis su *epidermio* paviršiumi. Jei įmanoma, kietąsias medžiagas reikia bandyti smulkių miltelių pavidalu. Pasibaigus veikimo medžiaga laikotarpiui, bandomoji medžiaga turi būti kruopščiai nuplauta nuo *epidermio* paviršiaus vandeniniu buferiniu tirpalu arba 0,9 % NaCl. Atsižvelgiant į tai, kuris iš trijų patvirtinto tinkamumo RhE metodas taikomas, poveikio trukmė gali būti nuo 15 iki 60 min, o inkubavimo temperatūra – nuo 20 °C iki 37 °C. Šios poveikio trukmės ir temperatūros optimizuojamos kiekvienam RhE metodui ir išreiškia skirtingas būdingąsias šių metodų savybes; išsamiau žr. šių metodų standartinės taikymo procedūras (SOP) (26) (27) (28).
23. Kiekvienoje bandymų serijoje lygiagrečiai turi būti naudojamos NC ir PC, siekiant įrodyti, kad gyvybingumas (su NC), apsauginė funkcija ir pasireiškęs audinių jautrumas (su PC) atitinka anksčiau sukauptų duomenų priimtino intervalą. Siūloma PC yra 5 % vandeninis SDS. Siūlomos NC cheminės medžiagos yra vanduo arba fiziologinis tirpalas fosfatiniame buferyje (angl. *phosphate buffered saline*, PBS).

Ląstelių gyvybingumo matavimai

24. Svarbiausias bandymo procedūros elementas yra tai, kad gyvybingumas matuojamas ne iš karto, kai baigiama veikti bandomąja chemine medžiaga, bet praėjus pakankamai ilgam inkubaciniam laikotarpiui po veikimo ir audinių plovimo šviežia terpe. Per šį laikotarpį sudaromos sąlygos atsigausti po silpno dirginimo poveikio ir atsirasti aiškiam citotoksiniam poveikiui. Bandymo optimizavimo tarpsniu (11) (12) (13) (14) (15) buvo nustatyta, kad optimali inkubacinio laikotarpio po apdorojimo trukmė lygi 42 h.
25. MTT bandymas yra patvirtinto tinkamumo kiekybinis metodas, kuris turi būti taikomas ląstelių gyvybingumui pagal šį BM matuoti. Jis yra suderinamas su trimačiu audinio modeliu. Audinio ėminys 3 valandas laikomas reikiamos koncentracijos MTT tirpale (pvz., 0,3–1 mg/ml). Mėlynos spalvos formazano junginio nuosėdos ekstrahuojamos iš audinio tirpikliu (pvz., izopropanoliu, parūgštintu izopropanoliu), o formazano koncentracija matuojama nustatant OD esant 570 nm bangų ilgiui ir ne didesniai kaip ± 30 nm filtro juostos pločiui.
26. Bandomosios cheminės medžiagos optinės savybės arba jos cheminis poveikis MTT gali trukdyti atliekant tyrimą ir taip gali būti gautas klaidingas gyvybingumo įvertis (nes bandomoji medžiaga gali trukdyti atsirasti spalvai, leisti jai išnykti arba sukelti spalvos atsiradimą). Tai gali įvykti, kai tam tikra bandomoji medžiaga nevisiškai pašalinama iš audinio skalaujant arba kai ji prasiskverbia į *epidermį*. Jei bandomoji cheminė medžiaga tiesiogiai veikia MTT (MTT reduktorių), yra iš prigimties spalvota arba nusidažo apdorojant audinį, reikia naudoti papildomas kontrolines medžiagas, kad būtų galima aptikti bandomosios cheminės medžiagos trikdžius taikomam gyvybingumo matavimo metodui ir padaryti pataisą. Išsamų aprašą, kaip taikyti pataisą tiesioginiam MTT redukavimui ir trikdžiams dėl dažalų, galima rasti trijų patvirtinto tinkamumo metodų SOP (26) (27) (28).

Priimtimumo kriterijai

27. Pagal kiekvieną metodą, kai taikomos patvirtinto tinkamumo RhE modelių partijos (žr. 21 skirsnį), turi būti gautos tokios NC paveiktų audinių OD vertės, kurios rodytų visus vežimo bei priėmimo etapus ir visą dirginimo bandymo protokolo procesą praėjusių audinių kokybę. Kontrolinių medžiagų OD vertės neturi būti mažesnės nei pagal anksčiau sukauptus duomenis nustatytos apatinės ribinės vertės. Panašiai, PC, t. y. 5 % vandeniniu SDS, paveikti audiniai turi gebėti atsakyti į dirginančios cheminės medžiagos veikimą BM sąlygomis (26) (27) (28). Reikia nustatyti susijusius ir tinkamus kartotinių audinių kintamumo matavimus (pvz., jei taikomi standartiniai nuokrypiai (angl. *standard deviation*, SD), jie turi būti iš vienpusio 95 % leidžiamųjų nuokrypų intervalo, apskaičiuoto pagal anksčiau sukauptus duomenis; VRM SD < 18 %).

Rezultatų aiškinimas ir prognozavimo modelis

28. Gautos kiekvienos bandomosios cheminės medžiagos OD vertės gali būti taikomos nustatant gyvybingumo procentinę dalį, palyginti su NC, kurių gyvybingumas prilyginamas 100 %. Ribinė ląstelių gyvybingumo procentinės dalies vertė, skirianti dirginančias bandomąsias chemines medžiagas nuo neklasifikuojamųjų, ir statistinė (-ės) procedūra (-os), taikyta (-os) rezultatams įvertinti ir dirginančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti, turi būti aiškiai apibrėžtos ir patvirtintos dokumentais, taip pat turi būti įrodytas jų tinkamumas. Toliau pateiktos dirgimui prognozuoti naudojamos ribinės vertės:

- laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga yra dirginanti odą pagal JT GHS/ES KŽP 2-ąją kategoriją, jei audinio gyvybingumas po veikimo medžiaga ir paskesnio inkubavimo yra mažesnis arba lygus (\leq) 50 %,
- atsižvelgiant į reglamentavimo sistemą, kurioje naudojami šio BM rezultatai, gali būti laikoma, kad bandomoji cheminė medžiaga yra nedirginanti odos pagal JT GHS/ES KŽP „nėra kategorijos“ klasifikaciją, jei audinio gyvybingumas po veikimo medžiaga ir paskesnio inkubavimo yra didesnis kaip ($>$) 50 %.

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Duomenys

29. Lentelėse turi būti pateikti kiekvieno atskiro audinio kartotinio bandinio duomenys (pvz., optinio tankio vertės ir apskaičiuotų ląstelių gyvybingumo procentinių verčių duomenys kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai, įskaitant klasifikavimą), įtraukiant ir pakartotų bandymų, jei reikia, duomenis. Be to, ataskaitoje reikia pateikti kiekvienos bandymų serijos vidutinės vertės \pm standartinio nuokrypio duomenis. Ataskaitoje reikia nurodyti pastebėtas spalvotų bandomųjų cheminių medžiagų sąveikas su MTT reagentu.

Bandymo ataskaita

30. Bandymo ataskaitoje turi būti pateikta ši informacija:

Bandomoji ir kontrolinė cheminės medžiagos:

- cheminis (-iai) pavadinimas (-ai), pvz., CAS pavadinimas ir CAS numeris, EC pavadinimas ir numeris, jei žinomas,
- grynumas ir sudėtis (masės procentine (-ėmis) dalimi (-is)),
- fizikinės ir cheminės savybės (pvz., fizinė būseną, stabilumas, lakumas, pH ir tirpumas vandenyje, jei žinomas), svarbios atliekamam tyrimui),
- bandomųjų ir (arba) kontrolinių cheminių medžiagų apdorojimas prieš bandymą, jei taikomas (pvz., šildymas, malimas),
- laikymo sąlygos.

RhE modelio ir naudoto protokolo pagrindimas.

Bandymo sąlygos:

- naudota ląstelių sistema,
- visa su konkrečiu RhE modeliu susijusi informacija, įskaitant jo naudojimo charakteristikas. Ją turi sudaryti šie ir kiti duomenys:
 - i) gyvybingumas;
 - ii) apsauginė funkcija;
 - iii) morfologija;
 - iv) atkuriamumas ir prognozuojamumas;
 - v) kontrolinės medžiagos modelio kokybei nustatyti,
- išsami informacija apie taikytą bandymo procedūrą;
- naudotos bandomosios dozės, veikimo medžiaga trukmė ir inkubacinis laikotarpis po veikimo,
- visų bandymo procedūros pakeitimų aprašymas,

- nuoroda į anksčiau sukauptus modelio duomenis. Ją turi sudaryti šie ir kiti duomenys:
 - i) kokybės kontrolės duomenų priimtumas atsižvelgiant į anksčiau sukauptus partijos duomenis;
 - ii) teigiamų ir neigiamų kontrolinių verčių priimtumas atsižvelgiant į teigiamo ir neigiamo poveikio kontrolinių medžiagų vidurkius ir intervalus,
- taikytų vertinimo kriterijų, įskaitant prognozės modelio ribinio (-ių) taško (-ų) pagrindimo kriterijus, aprašymas,
- nuoroda į anksčiau sukauptus duomenis.

Rezultatai:

- atskirų bandomųjų cheminių medžiagų kiekvienos bandymų serijos ir kiekvieno kartotinio matavimo duomenų lentelės,
- su tiesioginiais MTT reduktoriais ir (arba) spalvotomis bandomosiomis cheminėmis medžiagomis naudotų kontrolinių medžiagų nuoroda,
- kitų pastebėtų reiškinų aprašymas.

Rezultatų aptarimas

Išvada

NUORODOS

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Available at: [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“, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (3) 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006. OL L 353, 2008 12 31, p. 1.
- (4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Available at: [<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. Available at: [<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. Available at: [<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. Available at: [<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)? Available at: [<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. Available at: [<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- α . Available at: [<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. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Available at: [<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. Available at: [<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. Available at: [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. Available at: [<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). Available at: [<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. Available at: [<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) 2001 m. rugpjūčio 6 d. Komisijos direktyva 2001/59/EB, 28-tą kartą derinanti su technikos pažanga Tarybos direktyvą 67/548/EEB dėl įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų medžiagų klasifikavimą, pakavimą ir ženklinimą etiketėmis, suderinimo, OL L 225, 2001 8 21, p. 1.
- (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 priedėlis

Apibrėžtys

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių artumas. Tikslumas yra bandymo metodo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (9).

Ląstelių gyvybingumas – parametras suminiam ląstelių populiacijos aktyvumui matuoti, pvz., ląstelių mitochondrinių dehidrogenazių geba redukuoti gyvybinį dažiklį MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolinio bromidą, tiazolilo mėlį), kuris, atsižvelgiant į galutinį matuojamą dydį ir taikomą bandymo schemą, yra susijęs su suminių ląstelių kiekiu ir (arba) jų gyvybingumu.

Sutapimas – tai yra bandymo metodų, kuriais gaunami vienareikšmiai rezultatai, naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas vartojamas kaip lygiavertis terminui „tikslumas“ ir apibrėžiamas kaip dalis visų išbandytų cheminių medžiagų, kurios tiksliai klasifikuotos kaip teigiamos arba neigiamos (9).

ET₅₀ – gali būti įvertintas kaip veikimo trukmė, per kurią ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % jas veikiant tam tikros pastovios koncentracijos cheminiu žymekliu, žr. taip pat IC₅₀.

ES KŽP (2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklavimo ir pakavimo) – Europos Sąjungos (ES) įgyvendina JT GHS cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikavimo sistemą (3).

GHS (Visuotinė suderinta cheminių medžiagų klasifikavimo ir ženklavimo sistema) – sistema, kurioje pateikiama cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) klasifikacija pagal standartizuotus fizinių pavojų, pavojų sveikatai bei aplinkai tipus ir nagrinėjami atitinkami informaciniai elementai, pvz., piktogramos, signaliniai žodžiai, pavojaus pareiškimai, išpėjamieji pareiškimai ir saugos duomenų lapai, kad būtų galima informuoti apie medžiagų neigiamą poveikį, siekiant apsaugoti žmones (įskaitant darbuotojus, darbininkus, vežėjus, vartotojus ir avarijų likvidatorius) ir aplinką (1).

IC₅₀ – gali būti įvertintas kaip cheminio žymeklio koncentracija, kuriai esant ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 % (IC₅₀) praėjus nustatytai veikimo trukmei, žr. taip pat ET₅₀.

Neribota dozė – ant *epidermio* tepamas bandomosios medžiagos kiekis, didesnis už kiekį, kurio reikia visiškai ir tolygiai uždengti *epidermio* paviršių.

„Aš irgi“ (angl. me-too) bandymas – šnekamosios kalbos pasakymas, kuriuo vadinamas bandymo metodas, struktūriškai ir funkciškai panašus į patvirtinto tinkamumo ir pripažintą pamatinį bandymo metodą. Toks bandymo metodas gali būti taikomas palyginamajam tinkamumo patvirtinimui. Taikomas pakaičiui su panašiu bandymo metodu (9).

Naudojimo charakteristikų standartai (angl. PS) – standartai, pagrįsti patvirtinto tinkamumo bandymo metodu, sudarantys pagrindą įvertinti siūlomo funkciškai ir mechanistiškai panašaus bandymo metodo palyginamumą. Įtraukiami šie dalykai: i) esminiai bandymo metodo komponentai, ii) būtinas sąrašas etaloninių cheminių medžiagų, parinktų iš tų medžiagų, kurios naudojamos patvirtinto tinkamumo bandymo metodo priimtinoms naudojimo charakteristikoms įrodyti, ir iii) panašus tikslumo ir patikimumo lygis, atsižvelgiant į pasiekiamą patvirtinto tinkamumo bandymo metodu, kurį siūlomas bandymo metodas turi turėti vertinamas pagal būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą (9).

Etaloninės cheminės medžiagos – cheminės medžiagos, kurios yra pasirinktos naudoti tinkamumo patvirtinimo procese ir kurių atveju atsakas *in vitro* arba *in vivo* etaloninėje bandymo sistemoje arba dominančių rūšių atsakas jau žinomas. Šios cheminės medžiagos turi būti tipinės cheminių medžiagų klasėms, kurioms numatyta taikyti bandymo metodą, ir turi perteikti visus atsakus, kurių tikimasi iš cheminių medžiagų, kurioms gali būti taikomas metodas – tiek stiprius, tiek silpnus, tiek neigiamus. Skirtingais tinkamumo patvirtinimo proceso etapais ir skirtingiems bandymo metodams bei paskirtims gali prireikti skirtingų etaloninių cheminių medžiagų rinkinių (9).

Tinkamumas – bandymo ir dominančio poveikio sąryšio ir bandymo prasmingumo bei naudingumo konkrečiam tikslui apibūdinimas. Tai yra matas, kiek tiksliai bandymu išmatuojamas ar numanomas dominantis biologinis poveikis. Tinkamumas apima bandymo metodo tikslumo (sutapimo) aspektą (9).

Patikimumas – juo įvertinamas laipsnis, kuriuo bandymo metodas gali būti ilgainiui atkartojamai atliekamas vienoje ir skirtingose laboratorijose, taikant tą patį protokolą. Jis įvertinamas skaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (9).

Pakaitinis bandymas – bandymas, skirtas pakeisti bandymą, kuris paprastai naudojamas ir pripažintas tinkamu pavojui nustatyti ir (arba) rizikai įvertinti, ir nustatytas kaip visomis įmanomomis bandymo aplinkybėmis ir naudojant visas galimas chemines medžiagas užtikrinantis lygiavertę ar geresnę žmonių ar gyvūnų sveikatos arba aplinkos apsaugą (pagal paskirtį), palyginti su pripažintu bandymu (9).

Jautrumas – visų teigiamų (veikliųjų) medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami vienareikšmiai rezultatai, tikslumo matas ir yra svarbus bandymo metodo tinkamumo vertinimo veiksnys (9).

Odos dirginimas – grįžtamosios odos pažeidimo gavimas po bandomosios medžiagos užtepimo ne ilgiau kaip 4 valandoms. Odos dirginimas yra vietinis neimunogeninis atsakas, kuris atsiranda netrukus po veikimo medžiaga (29). Jo pagrindinė savybė – grįžtamumas vykstant uždegiminiams atsakams ir esant su uždegiminiu procesu susijusiems būdingiems klinikiniams dirginimo požymiams (eritemai, edemai, niežėjimui ir skausmui).

Specifiškumas – visų neigiamų (neveikliųjų) medžiagų, kurios yra tinkamai klasifikuotos atliekant bandymą, dalis. Jis yra bandymo metodo, kuriuo gaunami vienareikšmiai rezultatai, tikslumo matas ir yra svarbus bandymo metodo tinkamumo vertinimo veiksnys (9).

Nuosekliųjų bandymų strategija – bandymai taikant bandymo metodus nuosekliu būdu; kiekvienu paskesniu lygiu bandymo metodai parenkami remiantis ankstesnio bandymo lygio rezultatais (9).

Bandomoji cheminė medžiaga (dar vadinama bandomąja medžiaga) – bet kuri medžiaga ar mišinys, bandomi taikant šį bandymų metodą.

2 priedėlis

Naudojimo charakteristikų standartai, skirti įvertinti siūlomus panašius ar pakeistus *in vitro* rekonstruoto žmogaus epidermio (RhE) metodus odos jautrinimui nustatyti

ĮVADAS

1. Naudojimo charakteristikų standartų (angl. PS) paskirtis – pateikti pagrindą, kuriuo remiantis būtų galima nustatyti, ar nauji bandymo metodai, tiek patentuoti (t. y. saugomi autoriaus teisių, turintys prekės ženklą, registruoti), tiek nepatentuoti, pasižymi pakankamu tikslumu ir patikimumu konkrečioms bandymo tikslams. Šie PS, pagrįsti patvirtinto tinkamumo ir pripažintais metodais, gali būti taikomi kitų panašių metodų (paprastai vadinamų „analogiškais“ bandymais), kurie grindžiami panašiais moksliniais principais ir kuriais matuojamas ar prognozuojamas tas pats biologinis ar toksinis poveikis, patikimumui ir tikslumui įvertinti (9).
2. Prieš naudojant modifikuotus metodus (t. y. pasiūlytus galimus patvirtinto bandymo metodo patobulinimus), turi būti atliktas įvertinimas, skirtas nustatyti siūlomų pokyčių poveikį bandymo naudojimo charakteristikoms ir kaip smarkiai tokie pokyčiai paveiks turimą informaciją, skirtą kitiems tinkamumo patvirtinimo proceso komponentams. Atsižvelgiant į siūlomų pokyčių skaičių ir pobūdį, gautas duomenis ir tuos pakeičius remiančius dokumentus, modifikuotiems metodams taikomas toks pat tinkamumo patvirtinimo procesas kaip ir aprašytas naujam bandymui arba, jei tinka, ribotas patikimumo ir tinkamumo įvertinimas taikant nustatytus PS (9).
3. Panašus („me-too“) arba modifikuoti kurio nors iš trijų patvirtinto tinkamumo metodų [„EpiSkin™“ (patvirtinto tinkamumo pamatinis metodas – VRM), „EpiDerm™“ SIT (EPI-200) ir „SkinEthic™“ RHE] metodai, siūloni naudoti pagal šį BM, turi būti įvertinti, kad būtų galima nustatyti jų patikimumą ir tikslumą naudojant chemines medžiagas, kurios atitinka visą Draize dirginimo balų intervalą. Kai įvertinama naudojant 20 rekomenduojamų etaloninių cheminių medžiagų (1 lentelė), pasiūlytų panašių ar modifikuotų metodų patikimumo ir tikslumo vertės turi būti panašios ar geresnės už vertes, gautas VRM (2 lentelė) (2) (16). Tikslumo ir patikimumo vertės, kurias reikia pasiekti, pateiktos šio priedėlio 8–12 skirsniuose. Įtrauktos atitinkamas cheminių medžiagų klases atstovaujanti neklasifikuojamos (JT GHS/ES KŽP „nėra kategorijos“) ir klasifikuojamos (JT GHS/ES KŽP 2-osios kategorijos) (1) medžiagos, kad pasiūlyto metodo patikimumą ir tikslumą būtų galima palyginti su VRM rodikliais. Metodo patikimumas, galimybės juo tinkamai identifikuoti JT GHS/ES KŽP 2-osios kategorijos dirginančias chemines medžiagas ir, atsižvelgiant į reglamentavimo sistemą, pagal kurią gaunami duomenys, galimybės juo tinkamai identifikuoti JT GHS/ES KŽP kategorijos neturinčias chemines medžiagas turi būti nustatyti prieš pradėdant jį taikyti naujų medžiagų bandymams.

4. Šie PS yra pagrįsti EC-ECVAM PS (8), atnaujintais pagal JT GHS ir ES KŽP klasifikavimo ir ženklavimo sistemas (1) (3). Pradiniai PS buvo apibrėžti atlikus tinkamumo patvirtinimo tyrimą (21) ir pagrįsti ES klasifikavimo sistema, apibrėžta 2001 m. rugpjūčio 6 d. Komisijos direktyvoje 2001/59/EB, 28-tą kartą derinančioje su technikos pažanga Tarybos direktyvą 67/548/EEB dėl įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų medžiagų klasifikavimą, pakavimą ir ženklimą etiketėmis, suderinimo ⁽¹⁾. Dėl JT GHS sistemos patvirtinimo klasifikavimui ir ženklavimui ES (ES KŽP) (3), kas įvyko tarp šio BM tinkamumo patvirtinimo tyrimo užbaigimo ir pabaigimo, PS buvo atnaujinti (8). Šis atnaujinimas daugiausia susijęs su: i) PS etaloninių cheminių medžiagų rinkiniu ir ii) nustatytais patikimumo ir tikslumo vertėmis (2) (23).

RHE ODOS DIRGINIMO IN VITRO BANDYMO METODŲ NAUDOJIMO CHARAKTERISTIKŲ STANDARTAI

5. PS sudaro šie trys elementai (9):

- I) Esminiai bandymo metodo komponentai
- II) Būtinasis etaloninių cheminių medžiagų sąrašas
- III) Nustatytos patikimumo ir tikslumo vertės

I) Esminiai bandymo metodo komponentai

6. Juos sudaro patvirtino tinkamumo metodo esminiai struktūriniai, funkciniai ir procedūriniai elementai, kurie turi būti įtraukti į pasiūlyto mechanistiškai ir funkciškai panašaus arba modifikuoto metodo protokolą. Šie komponentai apima unikalias metodo charakteristikas, svarbiausias procedūros detales ir kokybės kontrolės priemones. Esminių bandymo komponentų laikymasis padeda užtikrinti, kad panašus arba modifikuotas siūlomas metodas būtų grindžiamas tomis pačiomis sąvokomis kaip ir atitinkamas VRM (9). Esminiai bandymo metodo komponentai išsamiai aprašyti BM 16–21 skirsniuose, o bandymas turi būti atliekamas laikantis šių dalykų:

- Bendrųjų sąlygų (16 skirsnis)
- Funkcinių sąlygų, kurios apima:
 - gyvybingumą (17 skirsnis),
 - apsauginę funkciją (18 skirsnis),
 - morfologiją (19 skirsnis),
 - atkuriamumą (20 skirsnis) ir
 - kokybės kontrolę (21 skirsnis).

II) Būtinasis etaloninių cheminių medžiagų sąrašas

7. Etaloninės cheminės medžiagos naudojamos nustatyti, ar panašaus arba modifikuoto metodo, kuris įrodyta, kad yra struktūriškai ir funkciškai pakankamai panašus į VRM arba atitinka nedidelį vieno iš trijų patvirtinto tinkamumo metodų pakeitimą, patikimumas ir tikslumas yra panašus ar geresnis už VRM rodiklius (2) (8) (16) (23). I lentelėje išvardytos 20 rekomenduojamų etaloninių cheminių medžiagų yra iš skirtingų cheminių medžiagų klasių (t. y. jų kategorijų, pagrįstų funkcinėmis grupėmis) ir atitinka visą Draize dirginimo įverčių intervalą (nuo nedirginančios iki stipriai dirginančios). Į sąrašą įtrauktos cheminės medžiagos yra: 10 JT GHS/ES KŽP 2-osios kategorijos medžiagų ir 10 kategorijos neturinčių medžiagų, iš kurių 3 yra JT GHS 3-iosios papildomosios kategorijos cheminės medžiagos. Pagal šią bandymo metodą, 3-ioji papildomoji kategorija prilyginama „nėra kategorijos“. I lentelėje išvardytos cheminės medžiagos parinktos iš medžiagų, naudotų optimizavimo etapu, kuris buvo vykdomas po VRM pradinio tinkamumo patvirtinimo ir tinkamumo patvirtinimo tyrimo, tikrinant cheminį funkcionalumą ir fizinį būvį (14) (18). Šios etaloninės cheminės medžiagos yra mažiausias skaičius medžiagų, kurias reikia naudoti siūlomo panašaus ar modifikuoto metodo tikslumui ir patikimui įvertinti, tačiau neturi būti naudojamos kuriant naujus metodus. Tais atvejais, kai sąrašė cheminių medžiagų neturima, galima naudoti kitas medžiagas, apie kurias turima pakankamai *in vivo* duomenų, pirmiausia renkant iš medžiagų, naudotų optimizavimo etapu po VRM pradinio tinkamumo patvirtinimo ir tinkamumo patvirtinimo tyrimo. Jei norima, šį būtinąjį etaloninių cheminių medžiagų sąrašą galima papildyti kitomis cheminėmis medžiagomis, apie kurias turima pakankama *in vivo* duomenų, siekiant papildomai įvertinti siūlomo metodo tikslumą.

⁽¹⁾ OL L 225, 2001 8 21, p. 1.

1 lentelė

Būtinasis etaloninių cheminių medžiagų sąrašas, skirtas panašaus ar modifikuoto RhE odos dirginimo metodo tikslumo ir patikimumo vėrtėms nustatyti ⁽¹⁾

Cheminės medžiaga	CAS numeris	Fizikinė būseną	In vivo įvertis	VRM in vitro kat.	JT GHS/ES KŽP in vivo kat.
1-brom-4-chlorbutanas	6940-78-9	Skystis	0	2 kat.	Be kat.
dietilftalatas	84-66-2	Skystis	0	Be kat.	Be kat.
naftalenacto rūgštis	86-87-3	Kieta m.	0	Be kat.	Be kat.
alilfenoksiacetatas	7493-74-5	Skystis	0,3	Be kat.	Be kat.
izopropanolis	67-63-0	Skystis	0,3	Be kat.	Be kat.
4-metilbencaldehidą	3446-89-7	Skystis	1	2 kat.	Be kat.
metilsteartas	112-61-8	Kieta m.	1	Be kat.	Be kat.
heptilbutiratas	5870-93-9	Skystis	1,7	Be kat.	Be kat.
heksilsalicilatas	6259-76-3	Skystis	2	Be kat.	Be kat.
cinamaldehydas	104-55-2	Skystis	2	2 kat.	Be kat. (3-ioji papildomoji kat.) ⁽³⁾
1-dekanolis ⁽²⁾	112-30-1	Skystis	2,3	2 kat.	2 kat.
ciklamenaldehydas	103-95-7	Skystis	2,3	2 kat.	2 kat.
1-bromheksanas	111-25-1	Skystis	2,7	2 kat.	2 kat.
2-chlormetil-3,5-dimetil-4-metoksipiridino hidrochloridas	86604-75-3	Kieta m.	2,7	2 kat.	2 kat.
di-n-propil disulfidas ⁽²⁾	629-19-6	Skystis	3	Be kat.	2 kat.
kalio hidroksidas (5 % vand.)	1310-58-3	Skystis	3	2 kat.	2 kat.
5-(1,1-dimietil)-2-metil benzentiolis	7340-90-1	Skystis	3,3	2 kat.	2 kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazinas	5271-27-2	Kieta m.	3,3	2 kat.	2 kat.
Heptanalis	111-71-7	Skystis	3,4	2 kat.	2 kat.
tetrachloretilenas	127-18-4	Skystis	4	2 kat.	2 kat.

⁽¹⁾ Cheminių medžiagų atranka pagrįsta šiais kriterijais: i) chemines medžiagas galima nusipirkti, ii) jos atitinka visą Draize dirginimo balų intervalą (nuo nedirginančios iki stipriai dirginančios), iii) jos turi gerai apibrėžtą cheminę struktūrą, iv) jos atitinka tinkamumo patvirtinimo procese taikytą cheminį funkcionalumą ir v) jos nesusijusios su ypač didelio toksiškumo parametrais (pvz., kancerogeniškumu arba toksiškumu reprodukcijos sistemai) ir su labai didelėmis šalinimo išlaidomis.

⁽²⁾ Cheminės medžiagos, kurios yra dirginančios triušiu, bet yra patikimų įrodymų, kad jos nėra dirginančios žmonėms (31) (32) (33).

⁽³⁾ Pagal JT GHS, nėra ES KŽP.

III) Nustatytos patikimumo ir tikslumo vertės

8. Siekiant nustatyti pasiūlytų panašių ar modifikuotų metodų patikimumą ir tinkamumą, kad juos būtų galima taikyti skirtingose laboratorijose, visos 1 lentelėje išvardytos 20 etaloninių cheminių medžiagų turi būti išbandytos bent trijose laboratorijose. Tačiau, jei siūlomas metodas bus taikomas tik vienoje laboratorijoje, tinkamumui patvirtinti bandymai keliose laboratorijose nereikalingi. Vis dėlto svarbu, kad tokius tinkamumo patvirtinimo tyrimus nepriklausomai įvertintų pripažintos tarptautinės tvirtinimo institucijos, laikydamosi tarptautinių rekomendacijų (9). Kiekvienoje laboratorijoje visos 20 etaloninių cheminių medžiagų turi būti išbandytos trimis skirtingomis bandymų serijomis, atliekamomis su skirtingomis audinių partijomis ir per pakankamai ilgą laiko intervalą. Kiekvienos serijos metu turi būti lygiagrečiai išbandyti ne mažiau kaip trys audinių kartotiniai bandiniai, skirti kiekvienai įtrauktai cheminei medžiagai, NC ir PC.
9. Siūlomo metodo patikimumo ir tikslumo vertės turi būti skaičiuojamos atsižvelgiant į visus keturis toliau nurodytus kriterijus, užtikrinant, kad patikimumo ir tinkamumo vertės būtų apskaičiuojamos apibrėžtu ir nuosekliu būdu:
 1. Metodo variantiškumui laboratorijoje bei tarp laboratorijų ir prognozavimo gebai (tikslumui) apskaičiuoti tinka tik iki galo atliktų bandymų serijų duomenys.
 2. Galutinė kiekvienos iš etaloninių cheminių medžiagų klasifikacija kiekvienoje dalyvaujančioje laboratorijoje turi būti gaunama taikant gyvybingumo vidutinę vertę, gautą iš skirtingų visos bandymų serijos bandymų.
 3. Metodo variantiškumui tarp laboratorijų apskaičiuoti tinka tik tie cheminių medžiagų duomenys, kurie gauti iki galo atlikus bandymų serijas visose dalyvaujančiose laboratorijose.
 4. Tikslumo vertės turi būti skaičiuojamos remiantis atskirų laboratorijų prognozėmis, kurias 20-čiai etaloninių cheminių medžiagų gavo skirtingos dalyvaujančios laboratorijos.

Šiuo aspektu **bandymų seką** sudaro trys nepriklausomos serijos, vienoje laboratorijoje atliekamos su viena bandomąja chemine medžiaga. **Iki galo atlikta seka** – tai vienos bandomosios cheminės medžiagos bandymų serijų seka vienoje laboratorijoje, kurios visų serijų rezultatai galiojantys. Tai reiškia, kad dėl bet kurios negaliojančios serijos tampa netinkami visos trijų serijų sekos rezultatai.

Atkuriamumas laboratorijoje

10. Atlikus atkuriamumo laboratorijoje įvertinimą, klasifikacijų (JT GHS/ES KŽP 2-oji kategorija ir „nėra kategorijos“), nustatytų skirtingomis nepriklausomomis 20 etaloninių cheminių medžiagų bandymų serijomis vienoje laboratorijoje, sutapimas turi būti lygus arba didesnis (\geq) kaip 90 %.

Tarplaboratorinis atkuriamumas

11. Jei siūlomas metodas bus taikomas tik vienoje laboratorijoje, tarplaboratorinio atkuriamumo įvertinimas nebūtinas. Jei metodai skirti naudoti skirtingose laboratorijose, klasifikacijų (JT GHS/ES KŽP 2-oji kategorija ir „nėra kategorijos“), nustatytų skirtingomis nepriklausomomis 20 etaloninių cheminių medžiagų bandymų serijomis ne mažiau kaip trijose laboratorijose sutapimas turi būti lygus arba didesnis (\geq) kaip 80 %.

Prognozavimo geba (tikslumas)

12. Siūlomo panašaus ar modifikuoto metodo tikslumas (jautrumas, specifiskumas ir bendras tikslumas) turi būti panašus ar geresnis už VRM rodiklius, atsižvelgiant į papildomą informaciją, susijusią su dominančios rūšies tinkamumu (2 lentelė). Jautrumas turi būti lygus arba didesnis (\geq) kaip 80 % (2) (8) (23). Tačiau papildomas specialus apribojimas taikomas pasiūlyto *in vitro* metodo jautrumui, nes tik *in vivo* 2-osios kategorijos cheminės medžiagos, *1-dekanolis* ir *di-n-propil disulfidas*, gali būti neteisingai klasifikuotos kaip neturinčios kategorijos daugiau kaip vienoje dalyvaujančioje laboratorijoje. Specifiškumas turi būti lygus arba didesnis (\geq) kaip 70 % (2) (8) (23). Nėra papildomų apribojimų siūlomo *in vitro* metodo specifiskumui, t. y. bet kuri dalyvaujanti laboratorija gali neteisingai klasifikuoti bet kurią *in vivo* kategorijos neturinčią cheminę medžiagą, jei galutinis bandymo metodo specifiskumas atitinka priimtinas ribas. Bendras tikslumas turi būti lygus arba didesnis (\geq) kaip 75 % (2) (8) (23). Nors 1 lentelėje išvardytų 20 etaloninių cheminių medžiagų VRM jautrumas lygus 90 %, apibrėžta mažiausia jautrumo vertė bet kuriam panašiam ar modifikuotam metodui nustatyta 80 %, nes tiek *1-dekanolis* (ribinė cheminė medžiaga), tiek *di-n-propil disulfidas* (klaidingai neigiama VRM medžiaga) žinomos kaip nedirginančios žmonėms (31) (32) (33), nors bandymuose su triušiais nustatytos kaip dirginančios. Kadangi RhE modeliai grindžiami žmogaus kilmės ląstelėmis, jie gali prognozuoti šias chemines medžiagas kaip nedirginančias (JT GHS/ES KŽP „nėra kategorijos“).

2 lentelė

Būtiniosios jautrumo, specifiškumo ir bendro tikslumo prognozinės vertės, kad bet kuris panašus ar modifikuotas metodas būtų laikomas galiojančiu

Jautrumas	Specifiškumas	Bendras tikslumas
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Tyrimo priimtimumo kriterijai

13. Gali būti, kad vienas ar keli bandymai, skirti vienai ar kelioms bandomosioms cheminėms medžiagoms, neatitinka bandymo priimtimumo kriterijų, skirtų bandomosioms ir kontrolinėms medžiagoms, arba yra nepriimtini dėl kitų priežasčių. Trūkstamiems duomenims gauti, kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai leidžiama atlikti iki dviejų papildomų bandymų („pakartotinis bandymas“). Tiksliau sakant, kadangi, bandant pakartotinai, reikia lygiagrečiai bandyti ir PC bei NC, kiekvienai bandomajai cheminei medžiagai leidžiama atlikti iki dviejų papildomų bandymų serijų.
14. Suprantama, kad, net ir atlikus pakartotinius bandymus, mažiausias trijų galiojančių serijų skaičius kiekvienai išbandytai cheminei medžiagai nėra gaunamas su kiekviena etalonine chemine medžiaga kiekvienoje dalyvaujančioje laboratorijoje, todėl duomenų matrica gaunama ne visa. Tokiais atvejais, kad duomenų rinkiniai būtų laikomi priimtinais, turi būti laikomasi visų šių trijų kriterijų:
1. Su visomis 20 etaloninių cheminių medžiagų turi būti iki galo atlikta bent viena visa bandymų serijų seka.
 2. Kiekvienoje iš trijų dalyvaujančių laboratorijų, ne mažiau kaip 85 % serijų sekų turi būti iki galo atliktos (20 cheminių medžiagų; t. y. vienoje laboratorijoje leidžiamos trys negaliojančios bandymų serijų sekos).
 3. Turi būti iki galo atlikta ne mažiau kaip 90 % visų galimų serijų sekų bent trijose laboratorijose (kai 20 cheminių medžiagų bandomos 3 laboratorijose; t. y. iš viso leidžiamos 6 negaliojančios bandymų serijų sekos).“

3. Įrašomi šie skyriai

„B.49. IN VITRO ŽINDUOLIŲ LĄSTELĖS MIKROBRANDUOLIO BANDYMAS

ĮVADAS

1. *In vitro* mikrobranduolio (MNvit) tyrimas yra genotoksiškumo bandymas, skirtas tarpfazinių ląstelių citoplazmos mikrobranduoliams (angl. *micronuclei*, MN) aptikti. Mikrobranduoliai gali susidaryti iš acentrinių chromosomų fragmentų (t. y. neturinčių centromeros) arba išsčių chromosomų, kurie ląstelių dalijimosi anafazės etapu negali migruoti link polių. Šiuo tyrimu aptinkamas klastogeninių ir aneugeninių cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) (1) (2) aktyvumas ląstelėse, kurios dalijosi veikiant bandomąja medžiaga arba po veikimo. Pagal šį bandymo metodą (BM) galima naudoti protokolus su aktino polimerizacijos inhibitoriumi citochalazinu B (citoB) arba be jo. CitoB pridėjimas prieš tikslią mitozę suteikia galimybę atpažinti ir selektyviai analizuoti mikrobranduolių dažnumą ląstelėse, kuriose įvyko viena mitozė, nes tokios ląstelės turi du branduolius (3) (4). Pagal šį bandymo metodą taip pat galima naudoti protokolus be citokenezės blokavimo, jei yra įrodymų, kad analizuojamoje ląstelių populiacijoje įvyko mitozė.
2. Be MNvit tyrimo naudojimo cheminėms medžiagoms (medžiagoms ir mišiniams), kurios indukuoja mikrobranduolius, atpažinti, citokenezės blokavimo, imunocheminio kinetochorų ženklavimo arba hibridizacijos su centromeriniiais/telomeriniiais zondais (fluorescencinė *in situ* hibridizacija (FISH)) naudojimas taip pat gali suteikti informacijos apie chromosomų pažeidimo ir mikrobranduolių formavimosi mechanizmus (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Ženklavimo ir hibridizacijos procedūras galima taikyti, kai yra padidėjęs mikrobranduolių formavimasis ir tyrėjas nori nustatyti, ar tą padidėjimą sukėlė klastogeniniai ir (arba) aneugeniniai reiškiniai.
3. Mikrobranduoliai parodo pažeidimą, kuris buvo perduotas dukterinėms ląstelėms, o metafazės ląstelėse užfiksuotos chromosomų aberacijos negali būti perduodamos. Kadangi mikrobranduolius inferfazės ląstelėse galima įvertinti palyginti objektyviai, laboratorijos darbuotojai turi tik nustatyti, ar įvyko ląstelių dalijimasis ir kiek ląstelių turi mikrobranduolį. Todėl preparatai gali būti įvertinti palyginti sparčiai ir analizė gali būti automatizuota. Todėl vienos operacijos metu įmanoma įvertinti ne šimtus, o tūkstančius ląstelių, todėl tyrimo našumas padidėja. Galiausiai, kadangi mikrobranduoliai gali susidaryti chromosomoms įgaunant pirminę struktūrą („išnykstant“), yra galimybė aptikti aneuploidiją sukeliančias medžiagas, kurias sunku tyrinėti įprastais chromosomų aberacijos bandymais, pvz., OECD bandymų metodika 473 (šio priedo B.10 skyrius) (17). Vis dėlto MNvit tyrimas nesuteikia galimybės atskirti poliploidiją sukeliančias chemines medžiagas nuo sukeliančių klastogeniškumą, jei netaikoma speciali metodika, pvz., FISH, aprašyta 2 pastraipoje.

4. MNvit tyrimas yra *in vitro* metodas, kuriame paprastai naudojamos kultivuotos žmogaus arba graužikų ląstelės. Jis suteikia išsamų pagrindą ištyrinėti chromosomų pažeidimo potencialią *in vitro*, kadangi galima aptikti tiek aneugenus, tiek klastogenus.
5. MNvit tyrimas yra patikimas ir veiksmingas įvairių tipų ląstelėms ir esant citoB arba jo nesant. Yra daug duomenų, patvirtinančių MNvit tyrimo tinkamumą naudojant įvairias graužikų ląstelių linijas (CHO, V79, CHL/IU ir L5178Y) ir žmogaus limfocitus (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Pirmiausia tai yra tarptautiniai tinkamumo patvirtinimo tyrimai, kuriuos koordinavo Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22), ir tarptautinio genotoksiškumo bandymų seminario ataskaitos (4) (16). Turimi duomenys buvo pakartotinai įvertinti įrodymų visumos retrospektyviu tinkamumo patvirtinimo tyrimu, kurį atliko Europos Komisijos Europos alternatyvių metodų tinkamumo patvirtinimo centras (ECVAM), o ECVAM mokslinis patariamasis komitetas (ESAC) patvirtino tyrimo metodą kaip moksliskai patikimą (32) (33) (34). Buvo aprašytas žmogaus TK6 limfoblastų linijos (35), HepG2 ląstelių (36) (37) ir pagrindinių Sirijos žiurkėno embrioninių ląstelių (38) naudojimas, nors jos nebuvo naudojamos tinkamumo patvirtinimo tyrimuose.

APIBRĖŽTYS

6. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI

7. Bandymus atliekant *in vitro* paprastai reikia naudoti egzogeninį metabolinio suaktyvinimo šaltinį, nebent ląstelės yra metaboliškai pajėgios bandomųjų medžiagų atžvilgiu. Egzogeninė metabolinio suaktyvinimo sistema nevisiškai atkartoja *in vivo* sąlygas. Taip pat reikia pasirūpinti išvengti sąlygų, dėl kurių būtų gauti dirbtinai teigiami rezultatai, kurie neperteikia būdingo mutageniškumo ir gali atsirasti dėl tokių veiksmų kaip ryškūs pH ar osmoliškumo pokyčiai arba aukštas citoksiškumo lygis (39) (40) (41). Jei bandomoji cheminė medžiaga pridėjimo metu sukelia pH pokytį terpėje, pH turi būti pakoreguotas, geriausia – pagrindinio tirpalo buferiu, kad visi kiekiai esant bandomajai koncentracijai, ir visų kontrolinių medžiagų rodikliai išliktų tokie patys.
8. Mikrobranduolių indukcijai analizuoti svarbiausia, kad tiek paveiktose, tiek nepaveiktose kultūrose būtų įvykusi mitozė. Informatyviausias mikrobranduolių vertinimo etapas vyksta ląstelėse, kuriose veikiant bandomąja medžiaga arba po to įvyko viena mitozė.

BANDYMO PRINCIPAS

9. Žmogaus arba žinduolių kilmės ląstelių kultūros veikiamos bandomąja medžiaga tiek naudojant egzogeninį metabolinio suaktyvinimo šaltinį, tiek jo nenaudojant, nebent naudojamos pakankamos metabolizacinės gebos ląstelės. Visuose bandymuose naudojamas lygiagretus tirpiklis/nesiklis (VC) ir teigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos (PC).
10. Veikiant bandomąja medžiaga arba po to ląstelės auginamos pakankamą laikotarpį, kad įvyktų chromosomos arba verpstės pažeidimas, dėl kurio interfazinėse ląstelėse imtų formuotis mikrobranduoliai. Aneuploidijai indukuoti bandomoji medžiaga paprastai turi veikti mitozės metu. Surinktos ir nudažytos interfazinės ląstelės analizuojamos ieškant mikrobranduolių. Geriausia, jei mikrobranduoliai vertinami tik tose ląstelėse, kuriose mitozė baigta veikiant bandomąja medžiaga arba laikotarpiu po veikimo, jei toks taikomas. Citokinezės blokatoriumi paveiktose kultūrose tai pasiekama vertinant tik dvibranduolines ląsteles. Jei nėra citokinezės blokatoriaus, svarbu įrodyti, kad analizuotos ląstelės greičiausiai būtų besidalijusios veikiant bandomąja medžiaga arba po to. Pagal visus protokolus svarbu įrodyti, kad ląstelių proliferacija įvyko tiek kontrolinėje, tiek paveiktoje kultūrose, ir bandomosios medžiagos sukeltą citotoksiškumą arba citostazę reikia įvertinti kultūrose (arba lygiagrečiose kultūrose), kuriose įvertinti mikrobranduoliai.

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Preparatai

11. Galima naudoti kultivuotus pagrindinius žmogaus periferinius kraujo limfocitus (5) (19) (42) (43) ir keletą graužikų ląstelių linijų, pvz., CHO, V79, CHL/IU ir L5178Y ląsteles (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Kitų ląstelių linijų ir tipų naudojimas turi būti pagrįstas remiantis įrodytomis jų naudojimo charakteristikomis tyrime, kaip aprašyta priimtumo kriterijų skyriuje. Kadangi tyrimo jautrumui turės poveikį foninis mikrobranduolių dažnis, rekomenduojama naudoti ląstelių tipus, pasižyminčius žemu ir stabiliu mikrobranduolių formavimosi foniniu dažniu.

12. Žmogaus periferiniai kraujo limfocitai turi būti gauti iš jaunų (maždaug 18–35 metų amžiaus), sveikų, nerūkančių asmenų, kurie neseniai žinomai nebuvo paveikti genetiškai modifikuotomis cheminėmis medžiagomis ar spinduliuote. Jei ląstelės naudojimui surenkamos daugiau kaip iš vieno donoro, turi būti nurodytas donorių skaičius. Mikrobranduolių dažnis didėja su amžiumi ir ši tendencija ryškesnė moteryse, nei vyruose (44) ir į tai turi būti atsižvelgta parenkant kelių donorių ląsteles.

Terpės ir kultūros sąlygos

13. Kultūroms palaikyti turi būti naudojama atitinkama kultūrų terpė ir inkubacijos sąlygos (indai su kultūromis, CO₂ koncentracija ir drėgmė). Nustatytos ląstelių linijos ir atmainos turi būti reguliariai tikrinamos, ar nesikeičia modalinis chromosomų skaičius ir nėra užteršimo mikoplazma, o užsiteršus arba pakitus modaliniam chromosomų skaičiui neturi būti naudojamos. Turi būti žinomas normali ląstelių ciklo trukmė taikomomis kultūros sąlygomis bandymus atliekančioje laboratorijoje. Jei naudojamas citokinezės blokavimo metodas, citokinezės inhibitoriaus koncentracija turi būti optimizuota konkrečiam ląstelių tipui ir užtikrinti gerą dvibranduolinių ląstelių gamybą įvertinimui atlikti.

Kultūrų paruošimas

14. Nustatytos ląstelių linijos ir atmainos: ląstelės paskleidžiamos iš pradinių kultūrų, pasėjamos kultūros terpeje tokiu tankiu, kad kultūros nepasiektų monoslukos susiliejimo, o suspensijų kultūros nepasiektų per didelio tankio prieš surinkimo laiką, ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje.
15. Limfocitai: antikoagulantu (pvz., heparinu) apdorotas kraujas arba atskirti limfocitai kultivuojami esant mitogeniui, pvz., fitohemaglutininui (PHA), prieš paveikiant bandomąją medžiagą ir citoB.

Metabolinis suaktyvinimas

16. Kai naudojamos nepakankamo endogeninio metabolinio pajėgumo ląstelės, turi būti naudojamos egzogeninės metabolizavimo sistemos. Dažniausiai naudojama sistema yra kofaktoriais papildyta pomitochondrinė frakcija (S9), paruošta iš graužikų kepenų, apdorota fermentus indukuojančiomis medžiagomis, pvz., „Aroclor 1254“ (45) (46), arba fenobarbitono ir β-naftoflavono deriniu (46) (47) (48) (49). Pastarasis derinys neprieštarauja Stokholmo konvencijai dėl patvariųjų organinių teršalų (50) ir Reglamentui (EB) Nr. 850/2004 dėl patvariųjų organinių teršalų (66) ir įrodyta, kad jis toks pat veiksmingas kaip „Aroclor 1254“ indukuojant mišrios funkcijos oksidazes (46) (47) (48) (49). S9 frakcija paprastai naudojama 1–10 % (tūrio dalys) koncentracijos galutinėje bandymo terpeje. Metabolinio suaktyvinimo sistemos būseną gali priklausyti nuo bandomos cheminės medžiagos klasės ir kai kuriais atvejais gali būti tikslinga naudoti daugiau kaip vieną S9 koncentraciją.
17. Naudojant genetiškai modifikuotas ląstelių linijas, išreiškiančias tam tikrus žmogaus arba graužikų aktyvinančius fermentus, gali neberekėti egzogeninės metabolinio suaktyvinimo sistemos ir jos gali būti naudojamos kaip bandomosios ląstelės. Tokiais atvejais ląstelių linijų parinkimas turi būti mokslškai pagrįstas, pvz., mišriosios funkcijos oksidazių tinkamumu bandomosios medžiagos metabolizmui (51) ir jų reagavimu į žinomus klastogenus ir aneugenus (žr. atskirą skyrių apie priimtinumą kriterijus). Reikia pripažinti, kad bandomosios medžiagos gali nepavykti metabolizuoti išreikštos mišrios funkcijos oksidaze (-ėmis); tokiu atveju neigiami rezultatai nurodyti, kad bandomoji medžiaga negali indukuoti mikrobranduolių.

Bandomosios medžiagos paruošimas

18. Prieš apdorojant ląsteles, kietosios cheminės medžiagos ištirpinamos atitinkamuose tirpikliuose arba nešikliuose ir, jei reikia, atskiedžiamos. Skystos medžiagos gali būti pilamos tiesiai į bandymo sistemas ir (arba) prieš apdorojimą atskiedžiamos. Dujos ar lakiosios cheminės medžiagos turi būti bandomos atitinkamai pakeitus standartinius protokolus, pvz., apdorojant sandariuose induose (52) (53). Turi būti naudojama šviežiai paruošta bandomoji medžiaga, nebent stabilumo duomenys rodo, kad ją galima laikyti ilgesnį laiką.

Bandymo sąlygos

Tirpikliai / nešikliai:

19. Naudojamos koncentracijos tirpiklis / nešiklis neturi reaguoti su bandomąja medžiaga arba būti nesuderinamas su ląstelių išgyvenimu arba S9 veiklos palaikymu. Jei naudojamas kitas nei dažniausiai naudojamas tirpiklis / nešiklis (pvz., vanduo, ląstelių kultūros terpė, dimetilo sulfoksidas), jų naudojimas turi būti pagrįstas duomenimis, rodančiais jų suderinamumą su bandomąja medžiaga ir genetinio toksiškumo nebuvimą. Rekomenduojama, kad, kai įmanoma, pirmiausia būtų įvertinta galimybė naudoti vandeninį tirpiklį / nešiklį.

CitoB kaip citokinezės blokatoriaus naudojimas

20. Vienas iš svarbiausių MNvit tyrimo naudojimo charakteristikų aspektų yra užtikrinimas, kad vertinamos ląstelės poveikio metu arba laikotarpiu po poveikio, jei toks taikomas, būtų baigusios mitozę. CitoB yra medžiaga, kuri plačiausiai naudojama citokinezei blokuoti, nes slopina aktino susijungimą ir taip neleidžia dukterinėms ląstelėms atsiskirti po mitozės, dėl ko ima formuotis dvibranduolinės ląstelės (5) (54) (55). Todėl mikrobranduolių vertinimą galima apriboti ląstelėmis, kuriose mitozė įvyko poveikio metu arba po jo. Kartu galima matuoti bandomosios medžiagos poveikį ląstelių proliferacijos kinetikai. CitoB turi būti naudojamas kaip citokinezės blokatorius, kai naudojami žmogaus limfocitai, kadangi ląstelių ciklo trukmė tarp kultūrų ir donorų skirsis ir ne visi limfocitai reaguos į PHA. Bandant ląstelių linijas, kai norima nustatyti, ar vertinamos ląstelės pasidalijo, yra taikomi kiti metodai – jie aprašyti toliau (žr. 26 skirsnį).

21. Reikiamą citoB koncentraciją laboratorija turi nustatyti kiekvienam ląstelių tipui, kad pasiektų optimalų dvibranduolinių ląstelių dažnį tirpiklio/nešiklio kontrolinėse kultūrose. Tinkama citoB koncentracija paprastai yra 3–6 µg/ml.

Ląstelių proliferacijos bei citotoksiškumo matavimas ir poveikio koncentracijos parinkimas

22. Nustatant didžiausią bandymui naudojamą bandomosios medžiagos koncentraciją reikia vengti koncentracijų, kurios gali sukelti dirbtinių teigiamų rezultatų, pvz., tokių kurios sukelia per didelį citotoksiškumą, nusėdimą kultūros terpėje ir žymius pH arba osmoliškumo pokyčius (39) (40) (41).

23. Ląstelių proliferacijos matavimai atliekami siekiant užtikrinti, kad paveiktose ląstelėse tyrimo metu įvyko mitozė ir kad poveikimas atliekamas palaikant reikiamą citotoksiškumo lygį (žr. 29 skirsnį). Ląstelėse, kurioms būtinas metabolinis suaktyvinimas naudojant santykinį ląstelių skaičiaus padidėjimą (angl. *relative increase in cell counts*, RICC) arba santykinį populiacijos padvigubėjimą (angl. *relative population doubling*, RPD), citotoksiškumas turi būti nustatytas su metaboliniu ląstelių suaktyvinimu ir be jo, nebent naudojamas citoB. Kai naudojamas citoB, citotoksiškumas gali būti nustatytas taikant replikacijos indeksą (RI) (formulė pateikta 2 priedėlyje).

24. Ląstelių apdorojimas citoB ir santykinio vienbranduolinių, dvibranduolinių ir daugiabranduolinių ląstelių dažnio kultūroje išmatavimas yra tikslus metodas ląstelių proliferacijos poveikiui ir poveikio medžiaga citotoksiškam ar citostatiskam aktyvumui kiekybiškai įvertinti (5) ir užtikrina, kad būtų įvertintos tik tos ląstelės, kurios pasidalijo veikimo metu arba po to.

25. Tyrimuose naudojant citoB citostazę / citotoksiškumas gali būti kiekybiškai įvertinti pagal citokinezės blokavimo proliferacijos indeksą (angl. *cytokinesis-block proliferation index*, CBPI) (5) (26) (56) arba nustatyti pagal RI, apskaičiuotą pagal ne mažiau kaip 500 kultūros ląstelių (formulės pateiktos 2 priedėlyje). Kai citoB naudojamas ląstelių proliferacijai įvertinti, CBPI arba RI turi būti nustatyti pagal ne mažiau kaip 500 kultūros ląstelių. Šiuos ir kitus matavimus galima naudoti citotoksiškumui nustatyti palyginant paveiktas ir kontrolines kultūras. Naudingos informacijos gali suteikti kitų citotoksiškumo žymeklių įvertinimas (pvz., susiliejimo, ląstelių skaičiaus, apoptozės, nekrozės, metafazės skaičiaus).

26. Tyrimuose be citoB būtina įrodyti, kad kultūroje įvertintų ląstelių dalijimasis įvyko veikiant bandomąją medžiagą arba po to, nes kitaip galimos klaidingai neigiamos reakcijos. Tarp metodų, kurie naudojami užtikrinti, kad būtų vertinamos pasidalijusios ląstelės, yra bromodeoksiridino (BrdU) įterpimas ir paskesnis aptikimas, nustatant pasidalijusias ląsteles (57), klonų formavimas, kai paveikiamos ląstelės iš nuolatinių ląstelių linijų ir įvertinamos *in situ* ant mikroskopo objektyvio stiklelio (proliferacijos indeksas, PI) (25) (26) (27) (28) arba santykinio populiacijos padvigubėjimo (RPD) ar santykinio ląstelių skaičiaus padidėjimo (RICC) matavimas ar kiti patvirtinti metodai (16) (56) (58) (59) (formulės pateiktos 2 priedėlyje). Naudingos informacijos gali suteikti kitų citotoksiškumo ar citostazės žymeklių įvertinimas (pvz., susiliejimo, ląstelių skaičiaus, apoptozės, nekrozės, metafazės skaičiaus).

27. Turi būti įvertintos bent trys analizuojamos bandymo koncentracijos. Norint tai padaryti gali prireikti atlikti eksperimentą naudojant didesnę skaičių nedaug besiskiriančių koncentracijų ir išanalizuoti mikrobranduolių formavimąsi tose koncentracijose, sudarančiose reikiamą citotoksiškumo intervalą. Kita galima strategija – atlikti išankstinių citotoksiškumo bandymą, skirtą susiaurinti galutinio bandymo intervalą.

28. Didžiausia koncentracija turi būti siekiama sudaryti $55 \pm 5\%$ citotoksiškumą. Didesni lygiai gali sukelti chromosomų pažeidimą – šalutinį citotoksiškumo poveikį (60). Jei pasireiškia citotoksiškumas, parinktos bandomosios koncentracijos turi apimti intervalą nuo sukeliančios $55 \pm 5\%$ citotoksiškumą iki mažo arba jokio citotoksiškumo.

29. Jei stebima, kad citotoksiškumo nėra arba iškrenta nuosėdos, didžiausia bandomoji koncentracija turi atitikti 0,01 M, 5 mg/ml arba 5 µl/ml, taikant mažiausią vertę. Analizei parinktas koncentracijas paprastai turi skirti ne daugiau kaip 10 % intervalas. Jei bandomųjų medžiagų koncentracijos ir atsako sąryšio kreivė yra stati, gali reikėti glaudžiau išdėstyti bandomosios medžiagos koncentracijas, kad būtų įvertintos ir vidutinio bei mažo toksiškumo intervalo kultūros.
30. Jei ribojantis veiksnys yra tirpumas, didžiausia koncentracija, jeigu jos neriboja citotoksiškumas, turi būti mažiausia koncentracija, kuriai esant kultūrose matoma šiek tiek nuosėdų, jei tai netrukdo įvertinimui. Nuosėdų iškritimas turi būti įvertintas tokiais metodais kaip šviesos mikroskopija, užfiksuojant nuosėdas, kurios išlieka arba atsiranda kultivavimo metu (iki veikimo pabaigos).

Kontrolinės medžiagos

31. Kiekvieno eksperimento metu turi būti naudojamos lygiagrečios teigiamos ir tirpiklio/nešiklio kontrolinės medžiagos tiek su metaboliniu suaktyvinimu, tiek be jo.
32. PC būtinas įrodyti naudojamų ląstelių ir bandymo protokolo gebėjimą identifikuoti klastogenus bei aneugenus ir patvirtinti S9 preparato metabolinę gebą. PC turi būti naudojami žinomi mikrobranduolių formavimosi sukėlkliai, o jų koncentracija turi būti tokia, kad būtų nedidelis bet atkuriamas padidėjimas nuo foninio ir įrodytas bandymo sistemos jautrumas. PC koncentracijos turi būti parinktos taip, kad poveikiai būtų aiškūs, bet iškart neatskleistų vertintojui koduotų preparatų ant objektyvio stiklelio tapatumo.
33. Bandymo sistemos metaboliniam pajėgumui ir gebai aptikti klastogeną įrodyti turi būti naudojamos klastogenas, kuriame būtinas metabolinis suaktyvinimas (pvz., ciklofosfamidai, benzo[a]pirenas). Jei pateisinama, galima naudoti kitas PC. Kadangi kai kurios PC, kurioms būtinas metabolinis suaktyvinimas, tam tikromis poveikio sąlygomis ar tam tikrose ląstelių linijose gali būti aktyvios be egzogeninio metabolinio suaktyvinimo, jo poreikis ir S9 preparato aktyvumas turi būti išbandyti parinktoje ląstelių linijoje ir naudojant parinktas koncentracijas.
34. Šiuo metu nežinoma jokių aneugenų, kurių genotoksiniams aktyvumams būtinas metabolinis suaktyvinimas (16). Šiuo metu pripažintos aneugeninio aktyvumo PC yra, pvz., kolchicinas ir vinblastinas. Kitos cheminės medžiagos gali būti naudojamos, jei jos indukuoja mikrobranduolius vien tik arba daugiausia dėl aneugeninio aktyvumo. Siekiant išvengti dviejų PC (klastogeniškumui ir aneuginiškumui) be metabolinio suaktyvinimo, aneuginiškumo kontrolinė medžiaga gali būti naudojama kaip PC be S9, o klastogeniškumo kontrolinė medžiaga – naudojamos metabolinio suaktyvinimo sistemos tinkamumui išbandyti. PC klastogeniškumui ir aneuginiškumui turi būti naudojamos ląstelėse, kurioms nereikia S9. Siūlomos PC įtrauktos į 3 priedelį.
35. Galima apsvarstyti su cheminės medžiagos klase susijusios PC naudojimo galimybę, jei turima tinkamų cheminių medžiagų. Visos naudojamos PC turi būti tinkamos ląstelių tipui ir suaktyvinimo sąlygoms.
36. Tirpiklio / nešiklio kontrolinė medžiaga turi būti naudojamos kiekvienu užaugintos kultūros surinkimo metu. Be to, turi būti naudojama ir nepaveikta NC (jei nėra tirpiklio / nešiklio), nebent yra paskelbtų arba anksčiau laboratorijoje sukauptų duomenų apie kontrolę, rodančių, kad pasirinktu tirpikliu esant naudojamai koncentracijai nesukeliama jokių genotoksiškų ar kitų kenksmingų poveikių.

BANDYMO EIGA

Poveikio medžiaga planas

37. Siekiant padidinti aneugenų ar klastogenų, veikiančių tam tikru ląstelės ciklo etapu, aptikimo tikimybę, svarbu, kad bandomąja medžiaga visais ląstelių ciklais būtų paveiktas pakankamas skaičius ląstelių. Todėl ląstelių linijų ir pagrindinių ląstelių kultūrų veikimo medžiaga planas gali kiek skirtis nuo limfocitų plano, nes jų ląstelių ciklui pradėti būtinas mitogeninis stimuliavimas; tai išnagrinėta 41–43 skirsniuose (16).
38. Teoriniai aptarimai, kaip ir paskelbti duomenys (18), rodo, kad dauguma aneugenų ir klastogenų bus aptikti per trumpą 3–6 val. poveikio laikotarpį esant ir nesant S9, po ko bandomoji medžiaga pašalinama ir tęsiamas 1,5–2,0 ląstelių ciklų augimo laikotarpis (6). Ląstelės mėginiamas imamos praėjus laikui, kuris lygus 1,5–2,0 normalių (t. y. neapdorotų) ląstelių ciklų, po poveikio medžiaga pradžios arba pabaigos (žr. 1 lentelę). Mėginių ėmimo ar atsigavimo trukmė gali būti pailginta, jei žinoma arba įtariama, kad bandomoji medžiaga turi poveikį ląstelių ciklo trukmei (pvz., bandant nukleozidų analogus).

39. Dėl S9 preparatų galimo citotoksiškumo kultivuotoms žinduolių ląstelėms, pailginta 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų poveikio trukmė taikoma tik nenaudojant S9. Kai veikimas pailgintas, siūlomi variantai, kaip paveikti ląsteles bandomąja chemine medžiaga naudojant citoB arba jo nenaudojant. Šie variantai skirti situacijoms, kai gali būti nerimaujama dėl galimos bandomosios medžiagos ir citoB sąveikos.
40. Siūlomi ląstelių veikimo medžiaga planai pateikti 1 lentelėje. Šie bendrosios paskirties veikimo medžiaga planai gali būti pakeisti, atsižvelgiant į bandomosios medžiagos stabilumą ar reaktyvumą ar naudojamų ląstelių savitas augimo charakteristikas. Bet koks veikimas medžiaga turi prasidėti ir baigtis ląstelėms augant eksponentiškai. Šie planai išsamiau pateikti 41–47 skirsniuose.

1 lentelė

MNvit tyrimo ląstelių veikimo ir surinkimo laikas

Limfocitai, pagrindinės ląstelės ir ląstelių linijos, veikiamos medžiaga naudojant citoB	+ S9	Paveikite 3–6 val. esant S9; pašalinkite S9 ir veikimo terpę; pridėkite naują terpę ir citoB; surinkite praėjus 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų.
	– S9 Trumpas poveikis	Paveikite 3–6 val.; pašalinkite veikimo terpę; pridėkite naują terpę ir citoB; surinkite praėjus 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų.
	– S9 Pailgintas poveikis	<i>A variantas:</i> paveikite 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų, esant citoB; surinkite pasibaigus poveikio laikotarpiui. <i>B variantas:</i> paveikite 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų; pašalinkite bandomąją medžiagą; pridėkite naują terpę ir citoB; surinkite praėjus 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų.

Ląstelių linijos, veikiamos medžiaga nenaudojant citoB
(taip pat, kaip pagal pirmiau nurodytą planą, tik nepridedant citoB)

Limfocitai, pagrindinės ląstelės ir ląstelių linijos su citoB

41. Jei tai limfocitai, veiksmingiausias metodas yra pradėti veikti bandomąja medžiaga praėjus 44–48 val. po stimulavimo PHA, kai bus pasibaigęs ciklo sinchronizavimas (5). Pradiniame tyrime ląstelės 3–6 val. veikiamos bandomąja medžiaga nesant ir esant S9. Veikimo terpė pašalinama ir pakeičiama nauja terpe, kurioje yra citoB, o ląstelės surenkamos po 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų.
42. Jei abiejų pradinių trumpalaikio (3–6 val.) veikimo bandymų rezultatai yra neigiami arba dviprasmiai, naudojamas pailgintas veikimas medžiaga be S9. Galimi du veikimo variantai, kurie vienodai priimtini. Tačiau gali būti tikslingiau rinktis A variantą stimuliuojamiems limfocitams, kai eksponentinis augimas gali imti mažėti praėjus 96 val. po stimulavimo. Be to, pagal B variantą paskutinio mėginio ėmimo metu ląstelių kultūros turi nebūti pasiekusios susiliejimo.
- A variantas: ląstelės veikiamos bandomąja medžiaga 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų su surenkamos praėjus veikimo laikui.
- B variantas: ląstelės veikiamos bandomąja medžiaga 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų. Veikimo terpė pašalinama ir pakeičiama nauja, o ląstelės surenkamos po papildomų 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų.
43. Pagrindinės ląstelės ir ląstelių linijos turi būti veikiamos panašiai kaip limfocitai, išskyrus tai, kad jų nebūtina 44–48 val. stimuliuoti PHA. Jei ląstelės ne limfocitai, jos turi būti veikiamos taip, kad baigiantis tyrimui tevyktų jų logaritminio augimo etapas.

Ląstelių linijos be citoB

44. Ląstelės turi būti 3–6 val. veikiamos esant ir nesant S9. Veikimo terpė pašalinama ir pakeičiama nauja terpe, o ląstelės surenkamos po 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų.
45. Jei abiejų pradinių trumpalaikio (3–6 val.) veikimo bandymų rezultatai yra neigiami arba dviprasmiai, naudojamas pailgintas veikimas medžiaga (be S9). Galimi du veikimo variantai, kurie vienodai priimtini:
- A variantas: ląstelės veikiamos bandomąja medžiaga 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų su surenkamos praėjus poveikio laikui.
 - B variantas: ląstelės veikiamos bandomąja medžiaga 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų. Veikimo terpė pašalinama ir pakeičiama nauja, o ląstelės surenkamos po papildomų 1,5–2,0 normalių ląstelių ciklų.
46. 3–6 val. veikimo medžiaga pabaigoje monosluoksniuose gali būti mitozinių ląstelių (atpažįstamų iš apvalios formos ir atsiskyrimo nuo paviršiaus). Kadangi šios mitozinės ląstelės lengvai atsiskiria, jas galima prarasti pašalinant terpę su bandomąja medžiaga. Reikia pasirūpinti surinkti jas plaunant kultūras ir grąžinti atgal, kad surinkimo metu nebūtų prarastos mitozės etapo ląstelės, kuriose gali būti mikrobranduolių.

Kultūrų skaičius

47. Su kiekviena bandomosios medžiagos koncentracija turi būti naudojamos pakartotinės kultūros; tokios turi būti ir nešiklio/tirpiklio bei NC kultūros. Jeigu remiantis anksčiau sukauptais laboratorijos duomenimis galima įrodyti, kad skirtumai tarp kartotinio pasėjimo kultūrų yra minimalūs, galima naudoti pavienes kultūras. Jei naudojamos pavienės kultūros, rekomenduojama analizuoti didesnę koncentracijų skaičių.

Ląstelių surinkimas ir preparatų ant objekcinio stiklelio paruošimas

48. Kiekviena kultūra surenkama ir apdorojama atskirai. Ruošiamos ląstelės gali būti paveikiamos hipotoniniu šoku, tačiau šis veiksmas nebūtinai, jei pakankamas ląstelių paskleidimas pasiekiamas kitais būdais. Preparatą ant objekcinio stiklelio galima paruošti įvairiais būdais, jei įvertinimui gaunami aukštos kokybės ląstelių preparatai. Turi būti išsaugota ląstelių citoplazma, kad būtų galima aptikti mikrobranduolius ir (taikant citokinėzės blokavimo metodą) patikimai identifikuoti dvibranduolines ląsteles.
49. Preparatai ant objekcinio stiklelio gali būti nudažyti įvairiais metodais, pvz., Giemsa arba fluorescenciniais specialiais DNR skirtais dažikliais (59). Jei naudojami specialiai DNR skirti dažai (pvz., akridino oranžas (61) arba Hoechst 33258 dažas, turintis pironino-Y (62)), galima pašalinti kai kuriuos artefaktus, kurie atsiranda naudojant specialiai DNR neskirtus dažus. Mikrobranduolių turiniui (chromosomai ar jos fragmentui) identifikuoti gali būti naudojami antikinetochoro antikūnai, FISH su pancentrometriniais DNR zondais arba užpildinis *in situ* ženklinimas su pancentromeroms skirtais užpildais, kartu su atitinkamu DNR priešpriešiniu dažymu, jei domina mechanistinė informacija apie jų formavimąsi (15) (16). Gali būti naudojami kiti klastogenų ir aneugenų diferencijavimo metodai, jei įrodyta, kad jie veiksmingi.

Analizė

50. Prieš analizuojant mikroskopu visi preparatai ant objekcinio stiklelio, įskaitant preparatus su tirpikliu / nešikliu ir kontrolinėmis medžiagomis, turi būti nepriklausomai užkoduoti. Kitas būdas – analizuoti koduotus mėginius naudojantis patvirtinto tinkamumo, automatizuotą srauto citometrijos ar vaizdo analizavimo sistemą.
51. CitoB apdorotose kultūrose mikrobranduolių dažnis turi būti išanalizuotas bent 2 000 dvibranduolinių ląstelių kiekvienai koncentracijai (ne mažiau kaip 1 000 dvibranduolinių ląstelių iš vienos kultūros; po dvi kultūras vienai koncentracijai). Jei naudojamos pavienės kultūros, iš jų turi būti įvertinta ne mažiau kaip 2 000 dvibranduolinių ląstelių. Jei įvertinimui pagal kiekvieną koncentraciją yra gerokai mažiau kaip po 1 000 dvibranduolinių ląstelių iš vienos kultūros arba 2 000, jei naudojama pavienė kultūra, ir reikšmingo mikrobranduolių skaičiaus padidėjimo neaptikta, bandymas turi būti pakartotas naudojant daugiau ląstelių arba mažiau toksiškas koncentracijas (kas tinka). Reikia atsargumo nevertinti netaisyklingos formos dvibranduolinių ląstelių arba tų, kurių du branduoliai yra labai skirtingo dydžio; be to, dvibranduolinių ląstelių nereikia painioti su prastai pasklidusiomis daugiabranduolinėmis ląstelėmis. Ląstelės, kuriose yra daugiau kaip du pagrindiniai branduoliai, neturi būti analizuojamos vertinant mikrobranduolius, kadangi jose pradinis mikrobranduolių dažnis gali būti didesnis (63) (64). Vienbranduolinių ląstelių įvertinimas yra priimtinas, jei bandomoji medžiaga įrodytai veikia citoB aktyvumą.

52. Ląstelių linijose, tiriamose neapdorojus citoB, mikrobranduoliai turi būti išanalizuoti bent 2 000 ląstelių kiekvienai koncentracijai (ne mažiau kaip 1 000 ląstelių iš vienos kultūros; po dvi kultūras vienai koncentracijai). Jei naudojama tik po vieną kultūrą koncentracijai, iš tos kultūros turi būti įvertinta ne mažiau kaip 2 000 ląstelių.
53. Kai naudojamas citoB, ląstelių proliferacijai įvertinti (žr. 2 priedėlį) CBPI arba RI turi būti nustatyti pagal ne mažiau kaip 500 kultūros ląstelių. Jei medžiaga veikiama nesant citoB, svarbu pateikti įrodymą, kad vertinamos ląstelės proliferavo, kaip aptarta 24–27 skirsniuose.

Priimtimumo kriterijai

54. Laboratorija, siūlanti naudoti šiame BM aprašytą MNvit tyrimą, turi įrodyti savo gebėjimą patikimai ir tiksliai aptikti žinomo aneugeninio ir klastogeninio aktyvumo chemines medžiagas su metaboliniu suaktyvinimu ir be jo, taip pat ir žinomas neigiamo poveikio medžiagas, naudodama 3 priedėlyje nurodytas chemines medžiagas. Kaip savo gebėjimo teisingai taikyti į BM įrodymą laboratorija turi pateikti įrodymą, kad ląstelėse, kuriose vertinamas mikrobranduolio formavimasis, įvyko vienas branduolio pasidalijimas, jei bandymas atliekamas nenaudojant citoB.
55. 3 priedėlyje nurodytas chemines medžiagas rekomenduojama naudoti kaip etalonines. Galima naudoti pakaitines ar papildomas chemines medžiagas, jeigu jų aktyvumas žinomas ir jos indukuoja mikrobranduolius tokiu pačiu veikimo mechanizmu ir jei įrodyta, kad jos susijusios su cheminėmis medžiagomis, kurios bus bandomos taikant MNvit procedūrą. Pateisinimas gali būti tinkamumo patvirtinimo tyrimas, kuriame naudota plati medžiagų įvairovė arba kuris sutelktas į siauresnį spektrą, remiantis bandomosios medžiagos chemine klase ar tyrinėjamu pažaidos mechanizmu.
56. Tirpiklio / nešiklio kontrolinės medžiagos ir nepaveiktų kultūrų mikrobranduolių dažnumas turi būti atkuriamai mažas ir pastovus (paprastai 5–25 mikrobranduoliai/1 000 ląstelių, kai ląstelės yra 11 skirsnyje nurodyto tipo). Kitų tipų ląstelių atsakų intervalai gali būti kitokie ir jie turi būti nustatyti tvirtinant jų tinkamumą naudoti MNvit tyrime. Kontroliniams intervalams pagal anksčiau sukauptus duomenis sudaryti turi būti naudojami neigiamų medžiagų, tirpiklių ir PC duomenys. Šios vertės turi būti naudojamos nusprendžiant dėl lygiagrečios NC/PC tinkamumo eksperimentui.
57. Jei tyrimui siūlomi nedideli protokolo pakeitimai (pvz., naudoti automatizuotą, o ne rankinę įvertinimo metodiką; naudoti naują ląstelių tipą), pakeitimo veiksmingumas turi būti įrodytas prieš pakeistą protokolą imant laikyti tinkamu naudoti. Veiksmingumo įrodymas apima įrodymą, kad galima aptikti pagrindinius chromosomos pertraukimo ir padidėjimo ar sumažėjimo mechanizmus ir kad atskiros bandomosios medžiagos klasei ar plačiai medžiagų grupei galima gauti atitinkamus teigiamus ir neigiamus rezultatus.

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Rezultatų vertinimas

58. Jei naudojama citokinezės blokavimo metodika, vertinant mikrobranduolių indukciją naudojamas tik dvibranduolinių ląstelių su mikrobranduoliais (nepriklausomai nuo mikrobranduolių skaičiaus ląstelėje) dažnis. Naudingos informacijos gali suteikti ląstelių su vienu, dviem ar keliais mikrobranduoliais įvertinimas, bet tai neprivaloma.
59. Lygiagrečiai turi būti nustatyti visų medžiaga paveiktų ir tirpiklio/nešiklio kontrolinių kultūrų citotoksiškumo ir (arba) citostazės rodikliai (58). Visų medžiaga paveiktų ir kontrolinių kultūrų CBPI arba RI turi būti apskaičiuoti kaip ląstelių ciklo delsos rodikliai, kai taikomas citokinezės blokavimo metodas. Jei nėra citoB, turi būti taikomas RPD arba RICC ar PI (žr. 2 priedėlį).
60. Turi būti pateikti duomenys apie atskirą kultūrą. Be to, visi duomenys turi būti suvesti į lenteles.
61. Cheminės medžiagos, kurios MNvit tyrime indukuoja mikrobranduolius, tai gali daryti todėl, kad indukuoja chromosomų nutraukimą, netekimą arba abiejų veiksmų derinį. Siekiant nustatyti, ar mikrobranduolių indukcijos mechanizmą suaktyvina klastogeninė ir (arba) aneugeninė veikla, gali būti atliekama papildoma analizė naudojant antikinetochoro antikūnus, centromeroms skirtus *in situ* zondus ar kitus metodus.

Rezultatų vertinimas ir aiškinimas

62. Nėra reikalaujama papildomais bandymais tikrinti aiškiai teigiamą arba neigiamą reakciją. Dviprasmiai rezultatai gali būti patikslinti išanalizavus papildomas 1 000 ląstelių iš visų kultūrų, kad nebūtų prarastas kodavimas. Jei toks metodas neišaiškina rezultato, reikia atlikti papildomus bandymus. Tolesniuose eksperimentuose reikia atsižvelgti į tyrimo parametrų pasikeitimą iš atitinkamai platesnio arba siauresnio sąlygų intervalo. Gali pasikeisti tokie tyrimo parametrai kaip tiriamosios koncentracijos intervalas, veikimo medžiaga ir ląstelių surinkimo laikas ir (arba) metabolinio suaktyvinimo sąlygos.

63. Yra keletas teigiamo rezultato nustatymo kriterijų, pvz., su koncentracija susijęs arba statistiškai reikšmingas mikrobranduolių turinčių ląstelių skaičiaus padidėjimas. Pirmiausia turi būti apsvaistytas rezultatų biologinis tinkamumas. Įvertinimas, ar gautos vertės patenka ar nepatenka į anksčiau sukauptų duomenų kontrolinį intervalą, gali būti pravartus vertinant atsako biologinį reikšmingumą. Bandymo rezultatams įvertinti galima taikyti atitinkamus statistinius metodus (65). Tačiau statistinio bandymo rezultatai turi būti įvertinti dozės ir atsako sąryšio atžvilgiu. Taip pat reikia atsižvelgti į atkuriamumą ir anksčiau sukauptus duomenis.
64. Nors daugumos eksperimentų rezultatai bus aiškiai teigiami ar neigiami, kai kuriais atvejais, remiantis duomenų rinkiniu, nebus įmanoma priimti galutinio sprendimo apie bandomosios medžiagos aktyvumą. Tokie dviprasmiai arba abejotini atsakai gali būti gaunami neatsižvelgiant į eksperimento pakartojimų skaičių.
65. Teigiami MNvit tyrimo duomenys rodo, kad bandomoji medžiaga sukelia chromosomos trūkumą ar netekimą kultivuotose žinduolių ląstelėse. Neigiami rezultatai rodo, kad bandymo sąlygomis bandomoji medžiaga nesukelia chromosomos trūkumų ir (arba) padidėjimo ar sumažėjimo kultivuotose žinduolių ląstelėse.

Bandymo ataskaita

66. Bandymų ataskaitoje turi būti bent ši informacija, jeigu ji susijusi su tyrimu:

Bandomoji cheminė medžiaga

- identifikavimo duomenys ir Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos numeris bei EC numeris,
- fizinis būvis ir grynumas,
- fizikinės ir cheminės savybės, svarbios su tyrimo vykdymu,
- bandomosios cheminės medžiagos reaktyvumas su tirpikliu/nešikliu arba ląstelių kultūros terpe.

Tirpiklis/nešiklis

- tirpiklio/nešiklio pasirinkimo pagrindimas,
- bandomosios medžiagos tirpumas ir stabilumas tirpiklyje/nešiklyje.

Ląstelės

- naudojamų ląstelių tipas ir šaltinis,
- naudojamo ląstelių tipo tinkamumas,
- mikoplazmos nebuvimas, jei taikoma,
- informacija apie ląstelių ciklo trukmę, padvigubėjimo laiką arba proliferacijos indeksas,
- jei naudojami limfocitai, kraujo donorų lytis, amžius ir skaičius, jei taikoma,
- jei naudojami limfocitai, ar medžiaga veikiama visas kraujas ar atskirti limfocitai,
- eigų skaičius, jei taikoma,
- ląstelių kultūros išlaikymo metodai, jei taikoma,
- chromosomų modalinis skaičius,
- normali (neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos) ląstelių ciklo trukmė.

Bandymo sąlygos

- citokinezės blokavimo medžiagos (pvz., citoB) tapatumas, jeigu ji naudojama, ir jos koncentracija ir ląstelės poveikio trukmė,
- koncentracijų ir kultūrų skaičiaus parinkimo loginis pagrindas, įskaitant citotoksiškumo duomenis ir tirpumo apribojimus, jei turima duomenų,

- terpės sudėtis, CO₂ koncentracija, jei taikoma,
- bandomosios medžiagos koncentracija,
- nešiklio ir pridėtos bandomosios medžiagos koncentracija (ir (arba) tūris),
- inkubacijos temperatūra ir trukmė,
- veikimo medžiaga trukmė,
- surinkimo laikas po poveikimo,
- ląstelių tankis pasėjimo metu, jei taikoma,
- metabolinio suaktyvinimo sistemos tipas ir sudėtis, įskaitant priimtumo kriterijus,
- teigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos ir neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos,
- preparatų ant objektyvio stiklelio paruošimo metodai ir taikoma dažymo metodika,
- mikrobranduolių identifikavimo kriterijai,
- tirtų ląstelių skaičius,
- citotoksiškumo matavimo metodai,
- bet kokia su citotoksiškumu susijusi papildoma informacija,
- tyrimo vertinimo kaip teigiami, neigiami arba dviprasmiai kriterijai,
- taikomas (-i) statistinės analizės metodas (-ai),
- metodai, pvz., kinetochorų antikūnų naudojimas, skirti apibūdinti, ar mikrobranduolyje yra visos ar fragmentuotos chromosomos, jei taikoma.

Rezultatai

- naudojamas citotoksiškumo matas, pvz., CBPI arba RI, jei taikomas citokinezės blokavimo metodas; RICC, RPD arba PO, kai minėtas metodas netaikomas; kitos pastabos, jei taikoma, pvz., ląstelių susilieėjimas, apoptozė, nekrozė, metafazių skaičius, dvibranduolinių ląstelių dažnis,
- nuosėdų iškritimo požymiai,
- veikimo medžiaga terpės pH ir osmoliškumo duomenys, jei nustatyti,
- analizei priimtų ląstelių apibrėžimas,
- vienbranduolinių, dvibranduolinių ir daugiabranduolinių ląstelių paplitimas, jei taikomas citokinezės blokavimo metodas,
- ląstelių su mikrobranduoliais skaičius, atskirai kiekvienos medžiaga paveiktos ir kontrolinės kultūros, kai tinka, nurodant, ar tai dvibranduolinės ar vienbranduolinės ląstelės,
- koncentracijos ir atsako sąryšis, kai įmanoma,
- lygiagrečiai naudojamos neigiamo poveikio medžiagos (tirpiklio/nešiklio) ir teigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos (koncentracija ir tirpikliai) duomenys,
- anksčiau sukaupiti neigiamo poveikio medžiagos (tirpiklio/nešiklio) ir teigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos duomenys, nurodant intervalus, vidurkius ir standartinį nuokrypį bei pasikliaujamąjį intervalą (pvz., 95 %),
- statistinė analizė, p vertės, jeigu yra.

Rezultatų aptarimas

Išvados

NUORODOS

- (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 antikinetochore 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 aneugens 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 antikinetochore 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. Available at: [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., Senjyu, 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-Mutationsforschung, *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 25th meeting, 16–17 November, 2006, Available at: [<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, Available at: [<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 B₁ 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, pp. 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), Stokholmo konvencija dėl patvariųjų organinių teršalų, Jungtinių Tautų aplinkos programa (UNEP). Prieinama: [<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, pp. 463–467.
- (66) 2004 m. balandžio 29 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 850/2004 dėl patvariųjų organinių teršalų ir iš dalies keičiantis Direktyvą 79/117/EEB, OL L 229, 2004 4 30, p. 5.

I priedėlis

Apibrėžtys

Aneugenas – bet kokia medžiaga ar procesas, kurie, sąveikaudami su mitoziniu ir mejoziniu ląstelių dalijimosi ciklu, ląstelėse ar organizmuose sukelia aneuploidiją.

Aneuploidija – bet koks nukrypimas nuo normalaus diploidinio (arba haploidinio) chromosomų skaičiaus viena ar daugiau kaip viena chromosoma, tačiau ne visu chromosomų rinkiniu ar keliais (poliploidija).

Apoptozė – užprogramuota ląstelių žūtis, kuriai būdinga serija etapų, per kuriuos ląstelės suyra į membrana apsuptas daleles, kurios vėliau pašalinamos fagocitoze arba numetimo būdu.

Ląstelių proliferacija – ląstelių skaičiaus didėjimas dėl mitozinio ląstelių dalijimosi.

Centromera – chromosomos DNR sritis, kurioje susikabina abi chromatidės ir kurioje greta vienas kito prisitvirtinę abu kinetochorai.

Klastogenas – bet kokia medžiaga ar procesas, sukeliantys struktūrinius chromosomų nukrypimus ląstelių populiacijose ar organizmuose.

Citokinezė – ląstelių dalijimosi procesas iškart po mitozės, kuomet susidaro dvi dukterinės ląstelės, turinčios po vieną branduolį.

Citokinezės blokavimo proliferacijos indeksas (CBPI) – antrojo pasidalijimo ląstelių dalis medžiaga paveiktoje populiacijoje nepaveiktos kontrolinės kultūros atžvilgiu (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Citostazė – ląstelių augimo slopinimas (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Citotoksiškumas – žalingas poveikis ląstelių struktūrai ar funkcijai, kuris galiausiai sukelia ląstelės žūtį.

Genotoksiškas – bendrasis terminas, kuriuo išreiškiamas visų tipų DNR arba chromosomų pažeidimas, įskaitant nutraukimus, aduktų pergrupavimą, mutacijas, chromosomų aberacijas ir aneuploidiją. Ne visų tipų genotoksiškumo poveikiai sukelia mutacijas ar pastovų chromosomų pažeidimą.

Interfazinės ląstelės – ląstelės, nesančios mitozės fazės.

Kinetochoras – baltyminė struktūra, susidaranti chromosomos centromere, prie kurios dalijantis ląstelėms jungiasi verpstės siūlai ir dėl to dukterinės chromosomos tvarkingai išsidėsto dukterinių ląstelių poliuose.

Mikrobranduolys – atskiras mažas branduolys, esantis šalia pagrindinio ląstelių branduolio, atsiradęs mitozės ar mejozės telofazės metu, kai chromosomų fragmentai ar ištisos chromosomos įgauna pirminę struktūrą („išnyksta“).

Mitozės – ląstelės branduolio dalijimasis, paprastai skirstomas į profazę, prometafazę, metafazę, anafazę ir telofazę.

Mitozinis indeksas – metafazėje esančių ląstelių sąryšis, padalytas iš viso ląstelių populiacijos skaičiaus, rodantis tos ląstelių populiacijos proliferacijos laipsnį.

Mutageniškas – sukeliantis paveldimą DNR bazinės poros sekos (-ų) pokytį genuose arba chromosomų struktūroje (chromosomų aberacijas).

Neatsijungimas – porinių chromatidžių nesugebėjimas atsijungti ir tinkamai atsiskirti į besivystančias dukterines ląsteles, dėl ko pastarosiose susidaro nenormalus chromosomų skaičius.

Poliploidija – chromosomų skaičiaus aberacijos ląstelėse arba organizmuose, apimančios visą chromosomų rinkinį ar rinkinius, skirtingai nuo atskiros chromosomos ar chromosomų (aneuploidija).

Proliferacijos indeksas (PI) – citotoksiškumo matavimo metodas, kai nenaudojamas citoB (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Santykinis ląstelių skaičiaus padidėjimas (angl. RICC) – citotoksiškumo matavimo metodas, kai nenaudojamas citoB (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Santykinis populiacijos padvigubėjimas (angl. RPD) – citotoksiškumo matavimo metodas, kai nenaudojamas citoB (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Replikacijos indeksas (RI) – medžiaga paveiktos kultūros ląstelių pasidalijimo ciklo skaičiaus sąryšis su nepaveiktos kontrolinės kultūros rodikliu poveikio ir atsigavimo laikotarpiu (formulė pateikta 2 priedėlyje).

Bandomoji cheminė medžiaga (dar vadinama bandomąja medžiaga) – bet kuri medžiaga ar mišinys, bandomi taikant šį bandymų metodą.

2 priedėlis

Citotoksiškumo įvertinimo formulės

1. Kai naudojamas citoB, citotoksiškumo vertinimas turi būti grindžiamas citokinezės blokavimo proliferacijos indeksu (CBPI) arba replikacijos indeksu (RI) (16) (58). CBPI nurodo vidutinį ląstelės ciklą skaičių citoB poveikio laikotarpiu ir gali būti naudojamas ląstelių proliferacijai skaičiuoti. RI rodo santykinį branduolių skaičių medžiaga paveiktose kultūrose, palyginti su kontrolinėmis kultūromis ir gali būti naudojamas citostazės procentinei daliai skaičiuoti:

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

Ir:

T = bandomąja chemine medžiaga paveikta kultūra

C = nešiklio kontrolinė kultūra

Čia:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{vienbranduolinių ląstelių skaičius}) + (2 \times \text{dvibranduolinių ląstelių skaičius}) + (3 \times \text{daugiabranduolinių ląstelių skaičius}))}{(\text{bendras ląstelių skaičius})}$$

Taigi, CBPI lygus 1 (visos ląstelės yra vienbranduolinės) atitinka 100 % citostazę.

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

$$\text{RI} = \frac{((\text{dvibranduolinių ląstelių skaičius}) + (2 \times \text{daugiabranduolinių ląstelių skaičius})) \div (\text{bendras ląstelių skaičius})_T}{((\text{dvibranduolinių ląstelių skaičius}) + (2 \times \text{daugiabranduolinių ląstelių skaičius})) \div (\text{bendras ląstelių skaičius})_C} \times 100$$

T = medžiaga paveiktos kultūros

C = nešiklio kontrolinės kultūros

2. Taigi, RI = 53 % reiškia, kad, palyginti su skaičiumi kontrolinės kultūros ląstelių, kurios nepasidalijo sudarydamos dvibranduolines ir daugiabranduolines ląsteles, 53 % šio skaičiaus pasidalijo medžiaga paveiktoje kultūroje, t. y. 47 % citostazė.

3. Kai nenaudojamas citoB, citotoksiškumą rekomenduojama vertinti pagal santykinį ląstelių skaičiaus padidėjimą (RICC) arba santykinį populiacijos padvigubėjimą (RPD)(58), kadangi jais abiem atsižvelgiama į pasidalijusių ląstelių populiacijos dalį.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{Ląstelių skaičiaus padidėjimas medžiaga paveiktose kultūrose (galutinis – pradinis)})}{(\text{Ląstelių skaičiaus padidėjimas kontrolinėse kultūrose (galutinis – pradinis)})} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{Populiacijų padvigubėjimų skaičius medžiaga paveiktose kultūrose})}{(\text{Populiacijų padvigubėjimų skaičius kontrolinėse kultūrose})} \times 100$$

čia:

$$\text{Populiacijos padvigubėjimas} = [\log(\text{ląstelių skaičius po paveikimo} \div \text{pradinis ląstelių skaičius})] \div \log 2$$

4. Taigi, RICC arba RPD, lygus 53 %, rodo 47 % citotoksiškumą/citostazę.

5. Vartojant proliferacijos indeksą (PI), citotoksiškumas gali būti įvertintas skaičiuojant skaičių klonų, sudarytų iš 1 ląstelės (cl1), 2 ląstelių (cl2), 3–4 ląstelių (cl4) ir 5–8 ląstelių (cl8)

$$\text{PI} = \frac{((1 \times \text{cl1}) + (2 \times \text{cl2}) + (3 \times \text{cl4}) + (4 \times \text{cl8}))}{(\text{cl1} + \text{cl2} + \text{cl4} + \text{cl8})}$$

6. PI vartojamas kaip vertingas ir patikimas citotoksiškumo parametras ir *in situ* be citoB kultivuojamoms ląstelių linijoms (25) (26) (27) (28).

3 priedėlis

Naudojimo charakteristikoms įvertinti rekomenduojamos etaloninės cheminės medžiagos ⁽¹⁾

Kategorija	Cheminės medžiaga	CAS Nr.	EC Nr.
1. Klastogenai, aktyvūs be metabolinio suaktyvinimo			
	Citozino arabinozidas	147-94-4	205-705-9
	Mitomocinas C	50-07-7	200-008-6
2. Klastogenai, kuriems reikia metabolinio suaktyvinimo			
	Benzo(a)pirenas	50-32-8	200-028-5
	Ciklofosfamidai	50-18-0	200-015-4
3. Aneugenai			
	Kolchicinas	64-86-8	200-598-5
	Vinblastinas	143-67-9	205-606-0
4. Neigiamos medžiagos			
	Di(2-etilheksil)ftalatas	117-81-7	204-211-0
	Nalidiksini rūgštis	389-08-2	206-864-7
	Pirenas	129-00-0	204-927-3
	Natrio chloridas	7647-14-5	231-598-3

⁽¹⁾ Rekomenduojama naudoti etalonines chemines medžiagas. Galima naudoti pakaitines ar papildomas chemines medžiagas, jeigu jų aktyvumas žinomas ir jos indukuoja mikrobranduolius tokiu pačiu veikimo mechanizmu ir jei įrodyta, kad jos susijusios su cheminėmis medžiagomis, kurios bus bandomos taikant MNvit procedūrą. Atsižvelgiant į paskirtį, pateisinimas gali būti ir tinkamumo patvirtinimo tyrimas, kuriame naudota plati medžiagų įvairovė arba kuris sutelktas į siauresnį spektrą, remiantis bandomosios medžiagos chemine klase ar tyrinėjamu pažeidimo mechanizmu.

B.50. ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO BANDYMAS. DA

ĮVADAS

- OECD Cheminių medžiagų bandymo gairės ir ES bandymų metodai periodiškai persvarstomi atsižvelgiant į mokslo pažangą, kintančias reguliavimo reikmes ir gyvūnų gerovės sumetimais. Pirmasis bandymų metodas (BM) (B.42) pelių odos jautrinimui nustatyti – vietinio limfmazgio bandymas (LLNA; OECD bandymų metodika 429; šio priedo B.42 skyrius) buvo persvarstytas (1). LLNA tinkamumo patvirtinimas ir susijusių darbų apžvalga paskelbta (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) šaltiniuose. Pagal LLNA limfocitų proliferacijai matuoti naudojamas radioizotopinis timidinas arba jodas ir todėl tyrimas yra riboto naudojimo, kadangi sunku įsigyti, naudoti ar pašalinti radioaktyvias medžiagas. LLNA: DA (kurį sukūrė „Daicel Chemical Industries, Ltd.“) yra neradioaktyvaus pobūdžio LLNA modifikacija, kuria adenosino trifosfato (ATP) kiekis įvertinamas bioluminescencija kaip limfocitų proliferacijos rodikliu. LLNA: DA bandymo metodo tinkamumą patvirtino, apsvarstė ir rekomenduoja tarptautinė tarpusavio vertinimo komisija; jis laikomas naudingas su tam tikrais apribojimais identifikuojant odą jautrinančias ir nejautrinančias chemines medžiagas (10) (11) (12) (13). Šis BM yra parengtas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) sukeliama gyvūnų odos jautrinimo potencialui įvertinti. Pagal šio priedo B.6 skyrių ir OECD bandymų metodiką 406 naudojami bandymai su jūros kiaulytėmis, pirmiausia maksimizacijos ir Buehlerio bandymas su jūros kiaulytėmis (14). LLNA (šio priedo B.42 skyrius; OECD bandymų metodika 429) ir dvi neradioaktyvaus pobūdžio modifikacijos, LLNA: DA (šio priedo B.50 skyrius; OECD bandymų metodika 442 A) ir LLNA: BrdU-ELISA (šio priedo B.51 skyrius; OECD bandymų metodika 442 B), yra pranašesnės už bandymus su jūros kiaulytėmis pagal B.6 and OECD bandymų metodiką 406 (14) tuo, kad sumažinamas ir patobulinamas gyvūnų naudojimas.
- Panašiai, kaip LLNA, LLNA: DA metodu tiriamas odos jautrinimo indukcinis etapas ir gaunami kiekybiniai duomenys, tinkami dozės ir atsako sąryšiui įvertinti. Be to, galimybė aptikti odos jautriklis nenaudojant DNR žymėjimo izotopų, panaikina galimybę darbuotojams būti apšvitintiems dirbant ir atliekų pašalinimo sunkumus. Dėl to savo ruožtu galima naudoti daugiau pelių odos jautriklis aptikti, todėl galima dar sumažinti jūros kiaulyčių naudojimą odos jautrinimo potencialui išbandyti (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (14).

APIBRĖŽTYS

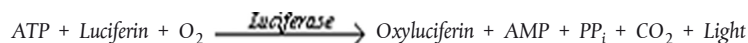
- Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

4. LLNA: DA yra modifikuotas LLNA metodas galimai odą jautrinančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti su tam tikrais apribojimais. Nereikia manyti, kad visais atvejais vietoj LLNA arba bandymo su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (14), reikia taikyti LLNA: DA bandymą; tai labiau reiškia, kad šis bandymas yra lygiavertis ir gali būti taikomas kaip pakaitinis metodas, pagal kurį teigiamų ir neigiamų rezultatų paprastai nebereikia papildomai patvirtinti (10) (11). Prieš atlikdama tyrimą bandymų laboratorija turi apsvarstyti visą turimą informaciją apie bandomąją medžiagą. Tokia informacija apima medžiagos tapatumą ir cheminę struktūrą, jos fizikines ir chemines savybes, visų kitų bandomosios medžiagos *in vitro* arba *in vivo* toksiškumo bandymų rezultatus ir giminingos struktūros medžiagų toksikologinius duomenis. Ši informacija turi būti apsvarstyta, siekiant nustatyti, ar LLNA: DA tinka bandomajai medžiagai (atsižvelgiant į tam tikrų medžiagų tipų nesuderinamumą su LLNA: DA (žr. 5 skirsnį)), ir parinkti tinkamą dozę.
5. LLNA: DA yra *in vivo* metodas, todėl jautrinančiam poveikiui dėl alerginio sąlyčio įvertinti naudojami gyvūnai. Tačiau jis turi galimybę sumažinti gyvūnų naudojimą šiam tikslui, palyginti su bandymais su jūros kiaulytėmis (B.6; OECD bandymų metodika 406) (14). Be to, LLNA: DA iš esmės pagerina būdą, kuriuo gyvūnai naudojami jautrinimui dėl alerginio sąlyčio bandyti (kelia mažiau skausmo ir kančių), kadangi, skirtingai nei B.6 and OECD bandymų metodika 406, taikant LLNA: DA nereikia sukelti ypač didelio odos jautrumo reakcijų. Nepaisant LLNA: DA pranašumų prieš B.6 ir OECD bandymų metodiką 406 (14), yra tam tikrų apribojimų, dėl kurių gali tekti taikyti B.6 ir OECD bandymų metodiką 406 (pvz., tiriant kai kuriuos metalus, klaidingi teigiami rezultatai tiriant tam tikrus odos dirgiklius (pvz., kai kurias paviršinio aktyvumo tipo chemines medžiagas) (6) (1 ir šio priedo B.42 skyrius), bandomosios medžiagos tirpumas). Be to, dėl cheminių klasių arba medžiagų, kuriose yra funkcinių grupių, veikiančių kaip galimos klaidinančiosios medžiagos (16), gali tekti atlikti bandymus su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406 (14)). Nustatytus LLNA apribojimus (1 ir šio priedo B.42 skyrius) rekomenduojama taikyti ir LLNA: DA (10). Be to, LLNA: DA gali netikti naudoti bandyti medžiagas, kurios turi poveikį ATP lygiui (pvz., medžiagas, kurios veikia kaip ATP inhibitoriai) arba tas, kurios trukdo tiksliai išmatuoti tarp-ląstelinį ATP (pvz., ATP ardančių fermentų buvimą, tarp-ląstelinio ATP buvimą limfmazgyje). Išskyrus tokius nustatytus apribojimus. LLNA: DA turi būti tinkamas bandant bet kurias chemines medžiagas, nebent tos medžiagos turi tokių savybių, kurios kenktų LLNA: DA tikslumui. Be to, reikia išnagrinėti ribinių teigiamų rezultatų galimybę, kai dirginimo rodiklio (SI) vertės gaunamos nuo 1,8 iki 2,5 (žr. 31, 32 skirsnius). Tai grindžiama 44 medžiagų tinkamumo patvirtinimo duomenų baze, taikant $SI \geq 1,8$ (žr. 6 skirsnį), kurioje LLNA: DA teisingai identifikavo visus 32 LLNA jautriklius, bet neteisingai identifikavo tris iš 12 LLNA nejautriklių, kurių SI vertės nuo 1,8 iki 2,5 (t. y. ribinis teigiamas rezultatas) (10). Tačiau, kadangi tas pats duomenų rinkinys buvo naudojamas SI vertėms nustatyti ir tyrimo prognozinėms savybėms apskaičiuoti, pateikti rezultatai gali pervertinti tikrąsias prognozinės savybes.

BANDYMO METODO PRINCIPAS

6. Pagrindinis principas, kuriuo pagrįstas LLNA: DA metodas, yra jautrinančiųjų medžiagų sukelta pirminė limfocitų proliferacija cheminės medžiagos poveikio vietą drenuojančiame limfmazgyje. Ši proliferacija yra proporcinga naudojamai dozei ir alergenų gebai jautrinti, taigi tai yra paprastas būdas objektyviai ir kiekybiškai išmatuoti jautrinimą. Proliferacija įvertinama palyginant vidutinę proliferaciją bandymo grupėse ir nešikliu paveiktose kontrolinėse (angl. *vehicle treated control*, VC) grupėse. Nustatomas vidutinės proliferacijos paveiktose grupėse ir kontrolinėse VC grupėse santykis, vadinamas SI, kuris turi būti $\geq 1,8$, kad bandomoji medžiaga galėtų būti toliau vertinama kaip galinti odą dirginanti medžiaga. Čia aprašytos procedūros pagrįstos ATP kiekio matavimu bioluminescencijos būdu (žinoma, kad ji koreliuoja su gyvų ląstelių skaičiumi) (17), kas parodo padidėjusį proliferuojančių ląstelių skaičių drenuojančiuose ausų limfmazgiuose (18) (19). Pagal bioluminescencijos metodą liuciferazės fermentas panaudojamas šviesai katalizuoti iš ATP ir liuciferino, vykstant šiai reakcijai:



Skleidžiamos šviesos intensyvumas tiesiškai proporcingas ATP koncentracijai ir išmatuojamas liuminometru. Liuciferino-liuciferazės tyrimas yra jautrus ATP kiekio nustatymo metodas, taikomas labai įvairiai paskirčiai (20).

BANDYMO METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšių parinkimas

7. Šiam bandymui pasirinkta gyvūnų rūšis – pelės. LLNA: DA tinkamumo patvirtinimo tyrimai buvo atlikti išimtinai su CBA/J veisle, kuri dėl to laikoma tinkamiausia veisle (12) (13). Naudojamos suaugusios pelių patelės, kurios yra neturėjusios vados ir neapvaisintos. Pradedant bandymą, gyvūnų amžius turi būti 8–12 savičių, o gyvūnų masės skirtumas turi būti kiek įmanoma mažesnis ir neviršyti 20 % vidutinės masės. Galima naudoti kitas veisles ir patinus, jei yra gauta pakankamai duomenų, kurie rodytų, kad nėra esminių veislei ir (arba) lyčiai būdingų atsako į LLNA: DA skirtumų.

Laikymo ir šėrimo sąlygos

8. Pelės turi būti laikomos grupėmis (21), nebent pateikiamas pakankamas loginis pagrindas, kodėl pelės reikia laikyti atskirai. Patalpos, kurioje laikomi bandomieji gyvūnai, temperatūra turi būti 22 ± 3 °C. Nors santykinė oro drėgmė turi būti ne mažesnė kaip 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikia užtikrinti 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis, taikant 12 val. šviesos ir 12 val. tamsos ciklą. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio.

Gyvūnų paruošimas

9. Gyvūnai pasirenkami atsitiktinai, ženklinami, kad būtų įmanoma kiekvieną identifikuoti (tačiau netaikomas joks ausų ženklinimas), ir laikomi narveliuose mažiausiai 5 paras prieš pradėdant taikyti dozes, kad galėtų priprasti prie laboratorijos sąlygų. Prieš veikimo medžiaga pradžią visi gyvūnai apžiūrimi, ar neturi pastebimų odos pažeidimų.

Dozavimo tirpalų paruošimas

10. Prieš užtepant ant pelių ausų, kietosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba paskleidžiamos tirpikliuose / nešikliuose ir, jei reikia, atskiedžiamos. Skystos cheminės medžiagos gali būti užtepamos grynos arba atskiestos. Netirpios cheminės medžiagos, pvz., tos, kurių paprastai pasitaiko medicinos įrangoje, prieš užtepant ant pelių ausų, padidintosios ekstrakcijos būdu išskiriamos atitinkamame tirpiklyje, kad būtų gautos visos galimos išskirti sudedamosios dalys. Bandomosios medžiagos paruošiamos kasdien, nebent stabilumo duomenys rodo, kad jas galima laikyti ilgesnį laiką.

Patikimumo tikrinimas

11. Teigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos (PC) naudojamos siekiant parodyti tyrimo tinkamumą joms reaguojant pakankamu ir atkartojamu jautrumu kaip jautrinančioms bandomosioms medžiagoms, kurių atsako dydis gerai apibūdinamas. Naudoti lygiagrečias PC rekomenduojama todėl, kad jos parodo laboratorijos kompetenciją sėkmingai atlikti bandymą kiekvieną tyrimą ir įvertinti atkuriamumą bei palyginamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų. Kiekvieno tyrimo metu naudoti PC reikalauja ir kai kurios reguliavimo institucijos, todėl naudotojai raginami pasikonsultuoti su atitinkamomis institucijomis prieš vykdydami LLNA: DA. Taigi, skatinama įprastai naudoti lygiagrečią PC, kad būtų išvengta papildomų bandymų su gyvūnais, reikalingų laikytis reikalavimų, kuris gali kilti PC naudojant tik periodiškai (žr. 12 skirsnį). PC turi sukelti teigiamą LLNA: DA atsaką esant tokiam poveikio lygiui, kuris numatytas padidinti $SI \geq 1,8$, palyginti su neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos (NC) grupe. PC dozė turi būti parenkama taip, kad nesukeltų per didelio odos sudirginimo ar sisteminio toksiškumo, o atsako sukėlimas būtų atkuriamas, bet ne per didelis (pvz., $SI > 10$ būtų laikomas per dideliu). Tinkamiausia PC yra 25 % heksilcinamono aldehydas (Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos [CAS] Nr. 101–86–0) ir 25 % eugenolis (CAS Nr. 97–53–0,) acetone: alyvų aliejuje (4:1, tūrio dalys). Gali pasitaikyti aplinkybių, kai, pateikus pakankamai įrodymų, galima naudoti kitas PC, atitinkančias pirmiau nurodytus kriterijus.
12. Nors naudoti lygiagrečią PC grupę rekomenduojama, gali būti situacijų, kuriomis gali pakakti periodinių bandymų naudojant PC (t. y. ≤ 6 mėnesių intervalais), jei tai laboratorijos, kurios reguliariai atlieka LLNA: DA (t. y. atlieka LLNA: DA ne rečiau kaip kartą per mėnesį) ir turi įsteigusios anksčiau sukauptų PC duomenų bazę, kuri rodo laboratorijos gebėjimą gauti atkuriamus ir tikslius rezultatus su PC. Pakankamas profesionalumas atliekant LLNA: DA tyrimus gali būti sėkmingai įrodomas pastoviai gaunant teigiamus rezultatus naudojant PC ne mažiau kaip 10-je nepriklausomų bandymų, atliktų per pagrįstą laikotarpį (t. y. trumpesnę kaip vieneri metai).
13. Lygiagreti PC visada turi būti naudojama, jei yra procedūrinių LLNA: DA pakeitimų (pvz., pasikeitė parengti darbuotojai, pakeistos bandymo metodo medžiagos ir (arba) reagentai, pakeista bandymo metodo įranga, pakeistas bandomųjų gyvūnų tiekėjas), o tokie pakeitimai turi būti užregistruoti laboratorijos ataskaitose. Turi būti apsvarstytas tokių pasikeitimų poveikis anksčiau sukauptų duomenų bazės tinkamumui, vertinant būtinybę sukurti naują anksčiau sukauptų duomenų bazę, skirtą PC rezultatų nuoseklumui dokumentuoti.
14. Tyrėjai turi suprasti, kad sprendimas vykdyti PC tyrimą periodiškai, o ne nuolat, turi padarinių neigiamų tyrimų rezultatų, gautų be lygiagrečios PC naudojimo, laikotarpiu tarp kiekvieno periodinio PC tyrimo, tinkamumui ir priimtinumui. Pz., jei, atliekant periodinį PC tyrimą, gaunamas klaidingas neigiamas rezultatas, gali būti kvestionuojami neigiami bandomosios medžiagos rezultatai, gauti laikotarpiu nuo paskutinio priimtino periodinio PC tyrimo iki nepriimtino periodinio PC tyrimo. Šių rezultatų padariniai turi būti stropiai įvertinti sprendžiant, ar nuolat vykdyti lygiagrečius, ar tik periodinius PC tyrimus. Taip pat reikia apsvarstyti galimybę lygiagrečios PC grupės tyrimams naudoti mažiau gyvūnų, jei tai mokslškai pateisinama ir jei laboratorija savo anksčiau sukauptais duomenimis įrodo, kad galima naudoti mažiau pelių (22).

15. Nors PC turi būti bandoma nešiklyje, kuris žinomai sukelia pastovų atsaką (pvz., acetono ir alyvų aliejaus mišinyje; 4:1, tūrio dalys), gali būti tam tikrų reguliavimo situacijų, kai gali prireikti iširti ir nestandartinį nešiklį (kliniškai/chemiškai susijusį preparatą) (23). Jei lygiagrečiai PC bandoma kitokiame nešiklyje nei bandomoji medžiaga, turi būti naudojama atskira VC, skirta lygiagrečiai PC.
16. Tais atvejais, kai vertinamos tam tikrai cheminei klasei ar atsakų sričiai priklausančios medžiagos, gali būti naudojamos ir palyginamosios cheminės medžiagos, kad būtų parodyta, jog bandymo metodas tinkamai veikia nustatant šių medžiagų odos jautrinimo potencialą. Atitinkamos palyginamosios medžiagos turi pasižymėti šiomis savybėmis:
- struktūriniu ir funkcinu panašumu į bandomosios cheminės medžiagos klasę,
 - žinomomis fizinėmis ir cheminėmis charakteristikomis,
 - apie jas turi būti patvirtinančių duomenų, gautų LLNA: DA tyrimais,
 - apie jas turi būti patvirtinančių duomenų, gautų kitų gyvūnų modeliais ir (arba) iš žmonių.

BANDYMO EIGA

Gyvūnų skaičius ir dozių dydis

17. Vienai dozės grupei naudojami ne mažiau kaip keturi gyvūnai, naudojant ne mažiau kaip tris bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas ir vieną lygiagrečią NC grupę, paveikiamą tik bandomosios medžiagos nešikliu, ir PC (lygiagrečią arba naujausią, remiantis laboratorijos politika pagal 11–15 skirsnius). Reikia apsvarstyti poreikį išbandyti keletą PC dozių, ypač bandant PC periodiškai. Išskyrus neveikimą bandomąja medžiaga, kontrolinių grupių gyvūnai turi būti prižiūrimi ir jais rūpinamasi taip pat, kaip poveikio grupės gyvūnais.
18. Dozė ir nešiklis turi būti parenkami laikantis (2) ir (24) šaltiniuose pateikiamų rekomendacijų. Paeilinės dozės paprastai parenkamos iš atitinkamos koncentracijos verčių eilės, pvz., 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ir t. t. Taikomai koncentracijos verčių eilei turi būti skirtas tinkamas loginis pagrindas. Reikia atsižvelgti į visą turimą toksikologinę informaciją (pvz., apie ūminį toksiškumą ir odos dirginimą) ir struktūrinę bei fizikinių ir cheminių savybių informaciją apie dominančią bandomąją cheminę medžiagą (ir (arba) struktūriškai panašias medžiagas), kad trys iš eilės taikomos koncentracijos vertės būtų parinktos taip, kad didžiausios koncentracijos poveikis būtų kuo didesnis, bet išvengta sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo (24) (25). Jei tokios informacijos neturima, gali prireikti pradinio atrankinio bandymo (žr. 21–24 skirsnius).
19. Nešiklis neturi kenkti ar iškraipyti bandymo rezultato ir turi būti parinktas taip, kad būtų kuo geresnis tirpumas, siekiant gauti didžiausią įmanomą koncentraciją gaminant tirpalą/suspensiją, tinkamą bandomajai medžiagai užtepti. Rekomenduojami nešikliai yra acetono ir alyvų aliejaus mišinys (4:1, tūrio dalys), N,N-dimetilformamidas, metiletilketonas, propilenglikolis ir dimetilsulfoksidas (6), tačiau galima naudoti kitus nešiklius, jei pateikiamas tinkamas loginis pagrindas. Tam tikrais atvejais papildomai kontrolei gali tekti naudoti klinikinio požiūriu atitinkantį tirpiklį arba komercinį preparatą, turintį bandomosios medžiagos. Reikia ypač stengtis užtikrinti, kad į nešiklyje būtų hidrofiliųjų medžiagų, kurios drėkintų odą ir iš karto nenutekėtų, įdedant soliubilizavimo priemonių (pvz., 1 % „Pluronic® L92“). Taigi reikia vengti naudoti grynai vandeninius nešiklius.
20. Apdorojant atskirų pelių limfmazgius galima įvertinti nepastovumą tarp gyvūnų ir statistiškai palyginti skirtumus tarp bandomosios medžiagos ir VC grupės matavimo rezultatų (žr. 33 skirsnį). Be to, tik tada, kai surenkami atskirų gyvūnų duomenys, realu įvertinti galimybę sumažinti pelių skaičių PC grupėje (22). Negana to, kai kurios reguliavimo institucijos reikalauja gauti atskirtų gyvūnų duomenis. Reguliarus atskirų gyvūnų duomenų rinkimas turi rūpinimosi gyvūnų gerove privalumų, nes išvengiama dvigubo bandymo, kurio reikėtų, jei bandomosios medžiagos rezultatus, iš pradžių gautus kitu būdu (pvz., iš jungtinių gyvūnų duomenų), vėliau vertintų reguliavimo institucijos, kurios vadovaujasi kitais reikalavimais (pvz., atskirų gyvūnų duomenimis).

Atrankinis bandymas

21. Jei neturima informacijos, skirtos didžiausiai bandomai dozei nustatyti (žr. 18 skirsnį), reikia atlikti atrankinį bandymą, kad būtų nustatytas tinkamas dozės lygis pagal LLNA: DA metodą. Atrankinio bandymo tikslas – nustatyti gaires didžiausiam pagrindinio LLNA: DA tyrimo dozės lygiui parinkti, kai neturima informacijos apie koncentraciją, kuri sukelia sisteminį toksiškumą (žr. 24 skirsnį) ir (arba) per didelį vietinį odos dirginimą (žr. 23 skirsnį). Didžiausias bandomas dozės lygis turi būti 100 % bandomosios medžiagos, jei tai skysčiai, arba didžiausia įmanoma koncentracija, jei tai kietosios medžiagos ar suspensijos.

22. Atrankinis bandymas atliekamas tokiomis pačiomis sąlygomis kaip ir pagrindinis LLNA: DA tyrimas, išskyrus tai, kad nevertinama limfmazgių proliferacija ir galima tirti mažiau gyvūnų kiekvienoje dozės grupėje. Siūloma naudoti vieną arba du gyvūnus vienai dozės grupei. Visos pelės kasdien stebimos, ar poveikio vietoje nepasireiškia sisteminio toksiškumo ar vietinio dirginimo klinikiniai požymiai. Kūno masė užrašoma prieš bandymą ir prieš jį pabaigiant (8 dieną). Abi kiekvienos pelės ausys stebimos, ar nėra eritemos ir įvertinama pagal 1 lentelę (25). 1 dieną (prieš dozę), 3 dieną (praėjus maždaug 48 valandų po pirmosios dozės), 7 dieną (24 valandos prieš pabaigimą) ir 8 dieną stomačiu (pvz., skaitmeniniu mikrometru arba ciferblatinio storio matuokliu) atliekami ausų storio matavimai. Be to, 8 dieną ausų storis gali būti įvertinamas ausų skylamušio svorio matavimais, atliekamais po to, kai gyvūnai humaniškai numarunami. Per didelį vietinį dirginimą rodo ≥ 3 edemos įvertis ir (arba) $\geq 25\%$ ausies storio padidėjimas bet kurią matavimo dieną (26) (27). Didžiausia pagrindiniam LLNA: DA tyrimui parenkama dozė yra antra pagal dydį dozė iš atrankinio bandymo koncentracijų eilės (žr. 18 skirsnį), nesukelianti sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo.

1 lentelė

Eritemos įverčiai

Pastebėjimas	Įvertis
Eritemos nėra	0
Labai nedidelė eritema (vos juntama)	1
Aiški eritema	2
Nuo vidutinės iki sunkios eritemos	3
Nuo sunkios eritemos (buroko raudonumo) iki šašo susidarymo, kuomet nebeįmanoma įvertinti eritemos sunkumo	4

23. Taikant LLNA metodą, dirgikliams nustatyti, be ausų storio padidėjimo 25 % (26) (27), naudojamas ir statistiškai reikšmingas paveiktų pelių ausų storio padidėjimas, palyginti su kontrolinėmis pelėmis (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Vis dėlto, nors statistiškai reikšmingas padidėjimas galimas ir ausies storiui esant mažesniai kaip 25 %, tai nėra stiejama konkrečiai su per dideliu dirginimu (30) (31) (32) (33) (34).
24. Šie klinikiniai požymiai gali rodyti sisteminį toksiškumą (35), kai yra naudojami kaip integruoto įvertinimo dalis, todėl gali nurodyti didžiausią dozės lygį, skirtą pagrindiniam LLNA: DA: nervų sistemos funkcijos pokyčiai (pvz., piloerekcija, ataksija, drebulys ir konvulsijos); elgsenos pokyčiai (pvz., agresyvumas, prausimosi pokyčiai, žymus aktyvumo lygio pokytis); kvėpavimo būdo pokyčiai (t. y. kvėpavimo dažnio ir intensyvumo pokyčiai, pvz., dusulys, žiopčiojimas ir karkalai) ir ėdalo bei vandens vartojimo pokyčiai. Be to, vertinant turi būti atsižvelgiama į letargijos ir (arba) nereagavimo požymius ir bet kokius didesnio už nedidelį ar trumpalaikį skausmą ir kančią klinikiniais požymiais arba $> 5\%$ kūno masės sumažėjimą nuo 1 iki 8 dienos, ir į mirtingumą. Gaištantys ar didelio skausmo ir kančios požymius rodantys gyvūnai turi būti humaniškai numarinti (36).

Pagrindinio bandymo eksperimentinis planas

25. Eksperimentinis bandymo planas atrodo taip:

- 1 diena. Atskirai nustatoma ir užrašoma kiekvieno gyvūno masė ir bet kokie klinikiniai pastebėjimai. Ant kiekvienos ausies išorinės pusės šepetėliu, suvilgytu 1 % natrio laurilo sulfato (SLS) vandeniniame tirpale, SLS tirpalas užtepamas keturiais penkiais potėpiais padengiant visą paviršių. Praėjus vienai valandai po SLS užtepimo, ant kiekvienos ausies išorinės pusės užtepama 25 μ l atitinkamai atskiesto bandomosios medžiagos tirpalo, vien tik nešiklio arba PC (lygiagrečios arba naujausios, remiantis laboratorijos politika pagal 11–15 skirsnius).
- 2, 3 ir 7 dienos. Pakartojamas pradinis poveikimas 1 % SLS vandeniniu tirpalu ir 1 dieną atlikta bandomosios medžiagos užtepimo procedūra.
- 4, 5 ir 6 dienos. Jokio veikimo.
- 8 diena. Užrašoma kiekvieno gyvūno masė ir bet kokie klinikiniai pastebėjimai. Praėjus maždaug 24–30 valandų po poveikimo 7 dieną, gyvūnai humaniškai numarunami. Kiekvienos pelės drenuojamieji ausų limfmazgiai išspjaunami ir kiekvieno gyvūno atskirai apdorojami fosfatiniame buferyje (PBS). Limfmazgių identifikavimo ir skrodimo aprašą bei schemas galima rasti (22) šaltinyje. Norint toliau stebėti vietinį odos atsaką pagrindiniame tyrime, į tyrimo protokolą gali būti įtraukti tokie papildomi parametrai kaip ausų eritemos įverčiai arba ausų storio matavimo rezultatai (gauti storio matuokliu arba ausų skylamušio svorio matavimais atliekant nekroskopiją).

Ląstelių suspensijos ruošimas

26. Limfmazgių ląstelių (LNC), išpjautų iš kiekvienos pelės abiejų ausų, pavienių ląstelių suspensija paruošiama limfmazgius sudedant tarp dviejų stiklinių objektinių stiklelių ir lengvai paspaudžiant, kad jie susitraiškytų. Įsitikinus, kad audinys pasklido plonu sluoksniu, stikleliai atskiriami. Audinys ant abiejų stiklelių pamerkiamas į PBS laikant kiekvieną stiklelį kampu virš Petri lėkštelės ir apiplauant PBS, kartu nugrąmdant audinį nuo stiklelio ląstelių grandikliu. Kadangi NC gyvūnų limfmazgiai maži, svarbu dirbti atsargiai, kad būtų išvengta bet kokio dirbtinio poveikio SI vertėms. Abiems stikleliams apiplauti turi būti naudojama 1 ml PBS. LNC suspensija Petri lėkštelėje turi būti lengvai homogenizuota ląstelių grandikliu. Po to 20 μ l LNC suspensijos mėginys paimamas mikropipete, pasirūpinant neįtraukti akimi matomos membranos, ir sumaišomas su 1,98 ml PBS, kad būtų gautas 2 ml mėginys. Po to pagal tą pačią procedūrą paruošiamas antras 2 ml mėginys, kad iš kiekvieno gyvūno būtų paruošta po du mėginius.

Ląstelių proliferacijos nustatymas (ATP kiekio limfocituose matavimas)

27. Padidėjęs ATP kiekis limfmazgiuose išmatuojamas liuciferino/liuciferazės metodu, naudojant ATM matavimo rinkinį, kuriuo bioluminescencija išmatuojama santykiniais liuminescencijos vienetais (angl. *Relative Luminescence Units*, RLU) Tyrimo laikas po gyvūno numaravimo, kada matuojamas ATP kiekis, kiekvieno gyvūno atveju turi būti vienodas (maždaug 30 minučių), kadangi laikoma, kad po gyvūno žūties ATP kiekis palaipsniui mažėja (12). Taigi, procedūrų serija nuo ausų limfmazgių išplovimo iki ATP matavimo turi būti atlikta per 20 minučių, laikantis nustatyto plano, kuris kiekvienam gyvūnui vienodas. ATP liuminescencija kiekviename 2 ml mėginyje turi būti matuojama taip, kad kiekvienam gyvūnui būtų gauti du matavimo rezultatai. Po to apskaičiuojamas liuminescencijos vidurkis, kuris naudojamas tolesniuose skaičiavimuose (žr. 30 skirsnį).

STEBĖJIMAI

Klinikiniai stebėjimai

28. Kiekviena pelė kruopščiai apžiūrima bent kartą per dieną bet kokiems vietinio dirginimui užtepimo vietoje arba sisteminio toksiškumo klinikiniams požymiams nustatyti. Visi pastebėjimai apie kiekvieną pelę yra sistemingai užrašomi. Į stebėsenos planus turi būti įtraukti kriterijai, pagal kuriuos galima tuoj pat nustatyti peles, kurioms pasireiškė sisteminis toksiškumas, per didelis vietinis odos dirginimas arba odos ėsdinimas, kad gyvūnus būtų galima numarinti (36).

Kūno masė

29. Kaip nurodyta 25 skirsnyje, atskirai kiekvieno gyvūno masė išmatuojama bandymo pradžioje ir po numatyto humaniško numaravimo.

REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

30. Kiekvienos poveikio grupės rezultatai išreiškiami kaip vidutinis SI. SI gaunamas dalijant kiekvienos bandomosios medžiagos grupės vidutinę RLU/gyvūnui vertę ir PC grupės vidutinę RLU/gyvūnui vertę iš tirpiklio/VC grupės vidutinės RLU/gyvūnui vertės. Taigi, VC vidutinė SI vertė lygi 1.
31. Vertinant rezultatus, atsakas laikoma teigiamu, jei $SI \geq 1,8$ (10). Tačiau, sprendžiant, ar ribinis rezultatas (t. y. SI vertė yra nuo 1,8 iki 2,5) turi būti paskelbtas teigiamu, galima atsižvelgti į dozės ir atsako sąryšio stiprumą, statistinį reikšmingumą ir tirpiklio/nešiklio bei PC atsakų nuoseklumą (2) (3) (37).
32. Kai gaunamas teigiamas ribinis atsakas (SI yra nuo 1,8 iki 2,5), tyrėjai gali pageidauti įvertinti papildomą informaciją, pvz., dozės ir atsako sąryšį, sisteminio toksiškumo arba per didelio sudirginimo požymius ir, kai tinka, statistinį reikšmingumą kartu su SI vertėmis, kad patvirtintų, jog tokie rezultatai iš tiesų teigiami (10). Reikia atsižvelgti ir į įvairias bandomosios medžiagos savybes, įskaitant tai, ar jos struktūra gimininga žinomų odą jautrinančių medžiagų struktūrai, ar ji sukelia per didelį pelių odos dirginimą, ir pastebimo dozės ir atsako sąryšio tipą. Šie ir kiti aspektai yra išsamiai aptarti kitur (4).
33. Surenkant duomenis apie kiekvieną pelę galima statistiškai išanalizuoti dozės ir atsako sąryšį tuose duomenyse ir jo laipsnį. Atliekant bet kokią statistinį įvertinimą, galima įtraukti dozės ir atsako sąryšio vertinimą ir tinkamai pakoreguotus bandymo grupių palyginimus (pvz., suporuotų dozavimo grupių palyginimus su lygiagrečiomis tirpiklio/VC). Į statistinę analizę gali būti įtraukta, pvz., tiesinė regresija arba Viljamso tyrimas, skirtas dozės ir atsako sąryšio tendencijoms įvertinti, ir suporuotų rezultatų palyginimų Daneto tyrimas. Rinkdamasis tinkamą statistinės analizės metodą tyrėjas turi turėti omenyje galimus variantiškumų skirtingumus ir kitas susijusias problemas, dėl kurių gali prireikti duomenų transformacijos ar neparametrinės statistinės analizės. Bet kuriuo atveju tyrėjui gali tekti atlikti SI skaičiavimus ir statistinę analizę su tam tikrais duomenų taškais (kartais vadinamais „riktais“) ir be jų.

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Duomenys

34. Duomenys pateikiami lentelėse, nurodant atskirų gyvūnų RLU vertes, DPM/gyvūnui grupės vidurkis, atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM) ir kiekvienos dozės grupės vidutinis SI, palygintas su lygiagrečios tirpiklio / nešiklio grupės rodikliu.

Bandymo ataskaita

35. Bandymo ataskaitoje pateikiama ši informacija:

Bandomoji ir kontrolinė cheminės medžiagos

- tapatumo duomenys (pvz., CAS numeris ir EC numeris, jei yra; šaltinis; grynumas; žinomos priemaišos; partijos numeris),
- fizikinė būsena ir fizikinės ir cheminės savybės (pvz., lakumas, stabilumas, tirpumas),
- jei tai mišinys – jo sudėtis ir komponentų procentinė dalis.

Tirpiklis / nešiklis

- tapatumo duomenys (grynumas; koncentracija (jei tinka); naudojamas tūris),
- nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandomo gyvūnai

- CBA pelių šaltinis,
- gyvūnų mikrobiologinė būsena, jei žinoma,
- gyvūnų skaičius ir amžius,
- gyvūnų šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.

Bandymo sąlygos

- ATP rinkinio šaltinis, partijos numeris ir gamintojo kokybės užtikrinimo / kokybės kontrolės duomenys,
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos ruošimą ir užtepimą,
- dozės pasirinkimo pagrindimas (įskaitant atrankinio bandymo rezultatus, jei bandymas buvo daromas),
- naudotos nešiklio ir bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, suminis užteptos medžiagos kiekis,
- išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (įskaitant pašaro tipą ar šaltinį, vandens šaltinį),
- poveikio medžiaga ir mėginių ėmimo tvarkaraščiai,
- toksiškumo matavimo metodai,
- tyrimo rezultatų vertinimo kaip teigiami arba neigiami kriterijai,
- išsami informacija apie bet kokius nukrypimus nuo protokolo ir paaiškinimas, kaip tas nukrypimas paveiks tyrimo sistemą ir rezultatus.

Patikimumo tikrinimas

- paskutinės patikimumo patikros rezultatų santrauka, įskaitant informaciją apie medžiagą, koncentraciją ir naudojamą nešiklį,

- bandymo laboratorijoje lygiagrečiai ir (arba) anksčiau sukaupti PC ir lygiagrečiai gauti neigiamos (tirpiklio / nešiklio) kontrolės duomenys,
- jei lygiagreti PC nebuvo naudojama, naujausio periodinio PC bandymo data ir laboratorijos ataskaita ir ataskaita su laboratorijos anksčiau sukauptais PC duomenimis, pagrindžiančiais lygiagrečios PC nenaudojimą.

Rezultatai

- atskirų pelių masė dozės gavimo ir numatyto numarinimo dieną; taip pat kiekvienos poveikio grupės vidurkis ir atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM),
- toksinio poveikio atsiradimo laikas ir požymiai, įskaitant kiekvieno gyvūno odos dirginimą medžiagos užtepimo vietoje, jei yra,
- kiekvieno gyvūno numarinimo ir ATP matavimo laikas,
- kiekvienos poveikio grupės atskiros pelės RLU ir SI verčių lentelės,
- kiekvienos poveikio grupės RLU/pelei vidurkis ir atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM) ir kiekvienos poveikio grupės riktų analizės rezultatai,
- apskaičiuotas SI ir atitinkamas variantiškumo matas, kuriuo atsižvelgiama į atskirų gyvūnų rezultatų variantiškumą tiek bandomosios medžiagos, tiek kontrolinėje grupėse,
- dozės ir atsako sąryšis,
- statistinė analizė, jei tinka.

Rezultatų aptarimas

- trumpas rezultatų, dozės ir atsako sąryšio analizės ir statistinės analizės, jei tinka, paaiškinimas, padarant išvadą, ar bandomoji medžiaga turi būti laikoma odos jautrikliau.

1.1. NUORODOS

- (1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<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. Available at: [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. Available at: [<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. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRRept2009.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. Available at: [<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. Available at: [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. Available at: [<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. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fdLLNA/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. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/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. Available at: [<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. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

1 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių artumas. Tikslumas yra bandymo metodo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (38).

Palyginamoji medžiaga – jautrinanti arba nejautrinanti medžiaga, naudojama kaip bandomosios medžiagos palyginimo standartas. Palyginamoji medžiaga turi pasižymėti tokiais savybėmis: i) pastoviu (-iais) ir patikimu (-ais) šaltiniu (-iais), ii) struktūriniu ir funkcinu panašumu į bandomų medžiagų klasę, iii) žinomomis fizikinėmis ir cheminėmis charakteristikomis, iv) patvirtinančiais duomenimis apie žinomus poveikius ir v) žinomu potencialu norimų atsakų intervale.

Klaidingai neigiamas rezultatas – bandymo metodu bandomoji medžiaga neteisingai įvertinta kaip neigiama arba neaktyvi, nors iš tiesų yra teigiama arba aktyvi.

Klaidingai teigiamas rezultatas – bandymu bandomoji medžiaga neteisingai įvertinta kaip teigiama arba aktyvi, nors iš tiesų yra neigiama arba neaktyvi.

Pavojus – neigiamo poveikio sveikatai arba ekologijai galimybė. Neigiamas poveikis pasireiškia tik tada, jei veikimas medžiaga yra pakankamo lygio.

Atkuriamumas tarp laboratorijų – laipsnio, kuriuo skirtingos kvalifikuotos laboratorijos, taikydamos tą patį protokolą ir bandančios tas pačias bandomąsias medžiagas, gali gauti kokybiškai ir kiekybiškai panašius rezultatus, matas. Atkuriamumas tarp laboratorijų nustatomas atliekant pradinio tinkamumo patvirtinimo ir tinkamumo pavirtinimo procesus ir rodo laipsnį, kuriuo bandymą galima sėkmingai perkelti tarp laboratorijų; tai dar vadinama tarplaboratoriniu atkuriamumu (38).

Atkuriamumas laboratorijoje – laipsnio, kuriuo kvalifikuoti darbuotojai toje pačioje laboratorijoje gali sėkmingai atkartoti rezultatus, taikydami konkretų protokolą skirtingu metu, matas. Dar vadinamas laboratoriniu atkuriamumu (38).

Riktas – pastebėjimas, kad vertė labai skiriasi nuo kitų atsitiktinio populiacijos ėminio verčių.

Kokybės užtikrinimas – valdymo procesas, per kurį asmenys, nepriklausomi nuo atliekančiųjų bandymus, įvertina, kaip laboratorija laikosi bandymo standartų, reikalavimų ir užrašų saugojimo procedūrų bei duomenų perdavimo tikslumo.

Patikimumas – juo įvertinamas laipsnis, kuriuo bandymo metodas gali būti ilgainiui atkartojamai atliekamas vienoje ir skirtingose laboratorijose, taikant tą patį protokolą. Jis įvertinamas skaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (38).

Odos jautrinimas – imunologinis procesas, vykstantis paveikų individą išoriškai paveikus cheminiu alergenu, kuris sukelia odos imuninį atsaką, dėl kurio gali atsirasti kontaktinis jautrinimas.

Dirginimo rodiklis (angl. SI) – vertė, apskaičiuojama bandomosios medžiagos jautrinimo potencialui įvertinti – tai yra paveiktų grupių proliferacijos sąryšio su lygiagrečios nešiklio kontrolinės grupės proliferacija koeficientas.

Bandomoji medžiaga (dar vadinama bandomąja chemine medžiaga) – bet kuri medžiaga ar mišinys, bandomi taikant šį bandymų metodą.

B.51. ODOS JAUTRINIMAS. VIETINIO LIMFMAZGIO BANDYMAS. BrdU-ELISA

ĮVADAS

1. OECD Cheminių medžiagų bandymo gairės ir ES bandymų metodai periodiškai persvarstomi atsižvelgiant į mokslo pažangą, kintančias reguliavimo reikmes ir gyvūnų gerovės sumetimais. Pirmasis bandymų metodas (BM) (B.42) pelių odos jautrinimui nustatyti – vietinio limfmazgio bandymas (LLNA; OECD bandymų metodika 429; šio priedo B.42 skyrius) buvo persvarstytas (1) šaltinis ir šio priedo B.42 skyrius). LLNA tinkamumo patvirtinimas ir susijusių darbų apžvalga paskelbta (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) šaltiniuose. Pagal LLNA limfocitų proliferacijai matuoti naudojamas radioizotopinis timidinas arba jodas ir todėl tyrimas yra riboto naudojimo, kadangi sunku įsigyti, naudoti ar pašalinti radioaktyvias medžiagas. LLNA: BrdU-ELISA [imunofermentinė analizė] yra neradioaktyvaus pobūdžio LLNA modifikacija, kurioje limfocitų proliferacijai matuoti naudojamos neradioaktyvus 5-brom-2-deoksiuridinas (BrdU) (Cheminių medžiagų santrumpų tarnybos [CAS] Nr. 59–14–3) ELISA tyrimo sistemoje. LLNA: BrdU-ELISA tinkamumą patvirtino, apsvartė ir rekomenduoja tarptautinė nepriklausoma mokslinė tarpusavio vertinimo komisija; jis laikomas naudingu su tam tikrais apribojimais identifikuojant odą jautrinančias ir nejautrinančias chemines medžiagas (10) (11) (12). Šis BM yra parengtas cheminių medžiagų (medžiagų ir mišinių) sukeliamam gyvūnų odos jautrinimo potencialui įvertinti. Pagal šio priedo B.6 skyrių ir OECD bandymų metodika 406 naudojami bandymai su jūros kiaulytėmis, pirmiausia maksimizacijos ir Buehlerio bandymas su jūros kiaulytėmis (13). LLNA (šio priedo B.42 skyrius; OECD bandymų metodika 429) ir dvi neradioaktyvaus pobūdžio modifikacijos, LLNA: BrdU-ELISA (šio priedo B.51 skyrius; OECD bandymų metodika 442 B) ir LLNA: DA (šio priedo B.50 skyrius; OECD bandymų metodika 442 A), yra pranašesnės už bandymus su jūros kiaulytėmis pagal B.6 and OECD bandymų metodiką 406 (13) tuo, kad sumažinamas ir patobulinamas gyvūnų naudojimas.

2. Panašiai, kaip LLNA, LLNA: BrdU-ELISA metodu tiriamas odos jautrinimo indukcinis etapas ir gaunami kiekybiniai duomenys, tinkami dozės ir atsako sąryšiui įvertinti. Be to, galimybė aptikti odos jautriklis nenaudojant DNR žymėjimo izotopų, panaikina galimybę darbuotojams būti apšvitintiems dirbant ir atliekų pašalinimo sunkumus. Dėl to savo ruožtu galima naudoti daugiau pelių odos jautrikliams aptikti, todėl galima dar sumažinti jūros kiaulyčių naudojimą odos jautrinimo potencialui išbandyti (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (13).

APIBRĖŽTYS

3. Vartojamos apibrėžtys pateiktos 1 priedėlyje.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

4. LLNA: BrdU-ELISA yra modifikuotas LLNA metodas galimai odą jautrinančioms cheminėms medžiagoms identifikuoti su tam tikrais apribojimais. Nereikia manyti, kad visais atvejais vietoj LLNA arba bandymo su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406) (13), reikia taikyti LLNA: BrdU-ELISA bandymą; tai labiau reiškia, kad šis bandymas yra lygiavertis ir gali būti taikomas kaip pakaitinis metodas, pagal kurį teigiamų ir neigiamų rezultatų paprastai nebereikia papildomai patvirtinti (10) (11). Prieš atlikdama tyrimą, bandymų laboratorija turi apsvarstyti visą turimą informaciją apie bandomąją medžiagą. Tokia informacija apima medžiagos tapatumą ir cheminę struktūrą, jos fizikines ir chemines savybes, visų kitų bandomosios medžiagos *in vitro* arba *in vivo* toksiškumo bandymų rezultatus ir giminingos struktūros medžiagų toksikologinius duomenis. Ši informacija turi būti apsvarstyta, siekiant nustatyti, ar LLNA: BrdU-ELISA tinka bandomajai medžiagai (atsižvelgiant į tam tikrų medžiagų tipų nesuderinamumą su LLNA: BrdU-ELISA (žr. 5 skirsnį)), ir parinkti tinkamą dozę.
5. LLNA: BrdU-ELISA yra *in vivo* metodas, todėl jautrinančiam poveikiui dėl alerginio sąlyčio įvertinti naudojami gyvūnai. Tačiau jis turi galimybę sumažinti gyvūnų naudojimą šiam tikslui, palyginti su bandymais su jūros kiaulytėmis (B.6; OECD bandymų metodika 406) (13). Be to, LLNA: BrdU-ELISA iš esmės pagerina būdą, kuriuo gyvūnai naudojami jautrinimui dėl alerginio sąlyčio bandyti, kadangi, skirtingai nei B.6 and OECD bandymų metodika 406, taikant LLNA: BrdU-ELISA nereikia sukelti ypač didelio odos jautrumo reakcijų. Be to, taikant LLNA: BrdU-ELISA nereikia naudoti adjuvantų, kurie reikalingi darant maksimizacijos bandymą su jūrų kiaulytėmis (šio priedo B.6 skyrius, 13). Taigi, LLNA: BrdU-ELISA sumažina gyvūnų kančias. Nepaisant LLNA: BrdU-ELISA pranašumų prieš B.6 ir OECD bandymų metodiką 406 (13), yra tam tikrų apribojimų, dėl kurių gali tekti taikyti B.6 ir OECD bandymų metodiką 406 (pvz., tiriant kai kuriuos metalus, klaidingi teigiami rezultatai tiriant tam tikrus odos dirgiklius [pvz., kai kurias paviršinio aktyvumo tipo chemines medžiagas] (6) (1 ir šio priedo B.42 skyrius), bandomosios medžiagos tirpumas). Be to, dėl cheminių klasių arba medžiagų, kuriose yra funkcinių grupių, veikiančių kaip galimos klaidinančiosios medžiagos (15), gali tekti atlikti bandymus su jūrų kiaulytėmis (t. y. B.6; OECD bandymų metodika 406 (13)). Nustatytus LLNA apribojimus (1 ir šio priedo B.42 skyrius) rekomenduojama taikyti ir LLNA: BrdU-ELISA (10). Išskyrus tokius nustatytus apribojimus, LLNA: BrdU-ELISA turi būti tinkamas bandant bet kurias chemines medžiagas, nebent tos medžiagos turi tokių savybių, kurios kenktų LLNA: BrdU-ELISA tikslumui. Be to, reikia išnagrinėti ribinių teigiamų rezultatų galimybę, kai dirginimo rodiklio (SI) vertės gaunamos nuo 1,6 iki 1,9 (žr. 31, 32 skirsnius). Tai grindžiama 43 medžiagų tinkamumo patvirtinimo duomenų baze, taikant SI $\geq 1,6$ (žr. 6 skirsnį), kurioje LLNA: BrdU-ELISA teisingai identifikavo visus 32 LLNA jautriklis, bet neteisingai identifikavo du iš 11 LLNA nejautriklis, kurių SI vertės nuo 1,6 iki 1,9 (t. y. ribinis teigiamas rezultatas) (10). Tačiau, kadangi tas pats duomenų rinkinys buvo naudojamas SI vertėms nustatyti ir tyrimo prognozinėms savybėms apskaičiuoti, pateikti rezultatai gali pervertinti tikrąsias prognozes savybes.

BANDYMO METODO PRINCIPAS

6. Pagrindinis principas, kuriuo pagrįstas LLNA: BrdU-ELISA metodas, yra jautrinančiųjų medžiagų sukelta pirminė limfocitų proliferacija cheminės medžiagos poveikio vietą drenuojančiame limfmazgyje. Ši proliferacija yra proporcinga naudojamai dozei ir alergeno gebai jautrinti, taigi tai yra paprastas būdas objektyviai ir kiekybiškai išmatuoti jautrinimą. Proliferacija įvertinama palyginant vidutinę proliferaciją bandymo grupėse ir nešiklį gavusiose kontrolinėse grupėse (VC). Nustatomas vidutinės proliferacijos paveiktose grupėse ir kontrolinėse VC grupėse santykis, vadinamas SI, kuris turi būti $\geq 1,6$, kad bandomoji medžiaga galėtų būti toliau vertinama kaip galinti odą dirginanti medžiaga. Čia aprašytos procedūros yra pagrįstos BrdU kiekio matavimu padidėjusiam proliferuojančių ląstelių skaičiui nustatyti drenuojančiuose ausų limfmazgiuose. BrdU yra analogiškas timidinui ir panašiai įsiterpia į proliferuojančių ląstelių DNR. BrdU įterpimas matuojamas ELISA metodu, pagal kurį naudojamas BrdU specifinis antikūnas, kuris dar pažymimas peroksidaze. Kai pridedama medžiagos, peroksidazė sureaguoja su substratu ir susidaro spalvotas produktas, kuris kiekybiškai įvertinamas pagal konkretų sugerties laipsnį mikrotitravimo plokštelių skaitytuvu.

BANDYMO METODO APRAŠYMAS**Gyvūnų rūšių parinkimas**

7. Šiam bandymui pasirinkta gyvūnų rūšis – pelės. LLNA: BrdU-ELISA tinkamumo patvirtinimo tyrimai buvo atlikti išimtinai su CBA/JN veisle, kuri dėl to laikoma tinkamiausia veisle (10) (12). Naudojamos suaugusios CBA/Ca arba CBA/J veislės pelių patelės, kurios yra neturėjusios vados ir neapvaisintos. Pradedant bandymą, gyvūnų amžius turi būti 8–12 savaičių, o gyvūnų masės skirtumas turi būti kiek įmanoma mažesnis ir neviršyti 20 % vidutinės masės. Galima naudoti kitas veisles ir patinus, jei yra gauta pakankamai duomenų, kurie rodytų, kad nėra esminių veislei ir (arba) lyčiai būdingų atsako į LLNA: BrdU-ELISA skirtumų.

Laikymo ir šėrimo sąlygos

8. Pelės turi būti laikomos grupėmis (16), nebent pateikiamas pakankamas loginis pagrindas, kodėl peles reikia laikyti atskirai. Patalpos, kurioje laikomi bandomieji gyvūnai, temperatūra turi būti 22 ± 3 °C. Nors santykinė oro drėgmė turi būti ne mažesnė kaip 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikia užtikrinti 50–60 %. Apšvietimas turi būti dirbtinis, taikant 12 val. šviesos ir 12 val. tamsos ciklą. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, neribojant geriamo vandens kiekio.

Gyvūnų ruošimas

9. Gyvūnai pasirenkami atsitiktinai, ženklinami, kad būtų įmanoma kiekvieną identifikuoti (tačiau netaikomas joks ausų ženklinimas), ir laikomi narveliuose mažiausiai 5 paras prieš pradedant taikyti dozes, kad galėtų priprasti prie laboratorijos sąlygų. Prieš veikimo medžiaga pradžią visi gyvūnai apžiūrimi, ar neturi pastebimų odos pažeidimų.

Dozavimo tirpalų paruošimas

10. Prieš užtepant ant pelių ausų, kietosios cheminės medžiagos ištirpinamos arba paskleidžiamos tirpikliuose/nešikliuose ir, jei reikia, atskiedžiamos. Skystos cheminės medžiagos gali būti užtepamos grynos arba atskiestos. Netirpios cheminės medžiagos, pvz., tos, kurių paprastai pasitaiko medicinos įrangoje, prieš užtepant ant pelių ausų, padidintosios ekstrakcijos būdu išskiriamos atitinkamame tirpiklyje, kad būtų gautos visos galimos išskirti sudedamosios dalys. Bandomosios medžiagos paruošiamos kasdien, nebent stabilumo duomenys rodo, kad jas galima laikyti ilgesnį laiką.

Patikimumo tikrinimas

11. Teigiamo poveikio kontrolinės cheminės medžiagos (angl. *positive control chemicals*, PC) naudojamos siekiant parodyti tyrimo tinkamumą joms reaguojant pakankamu ir atkartojamu jautrumu kaip jautrinančioms bandomosioms medžiagoms, kurių atsako dydis gerai apibūdintas. Naudoti lygiagrečiai PC rekomenduojama todėl, kad jos parodo laboratorijos kompetenciją sėkmingai atlikti bandymą per kiekvieną tyrimą ir įvertinti atkuriamumą ir palyginamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų. Kiekvieno tyrimo metu naudoti PC reikalauja ir kai kurios reguliavimo institucijos, todėl naudotojai raginami pasikonsultuoti su atitinkamomis institucijomis prieš vykdydami LLNA: BrdU-ELISA. Taigi, skatinama įprastai naudoti lygiagrečią PC, kad būtų išvengta papildomų bandymų su gyvūnais, reikalingų laikytis reikalavimų, kuris gali kilti PC naudojant tik periodiškai (žr. 12 skirsnį). PC turi sukelti teigiamą LLNA: BrdU-ELISA atsaką esant tokiam poveikio lygiui, kuris numatytas padidinti $SI \geq 1,6$, palyginti su neigiamo poveikio kontrolinės medžiagos (NC) grupe. PC dozė turi būti parenkama taip, kad nesukeltų per didelio odos sudirginimo ar sisteminio toksiškumo, o atsako sukėlimas būtų atkuriamas, bet ne per didelis (pvz., $SI > 14$ būtų laikomas per dideliu). Tinkamiausia PC yra 25 % heksilcinamono aldehidas (CAS Nr. 101–86–0) ir 25 % eugenolis (CAS Nr. 97–53–0), acetone: alyvų aliejuje (4:1, tūrio dalys). Gali pasitaikyti aplinkybių, kai, pateikus pakankamai įrodymų, galima naudoti kitas PC, atitinkančias pirmiau nurodytus kriterijus.
12. Nors naudoti lygiagrečią PC grupę rekomenduojama, gali būti situacijų, kuriomis gali pakakti periodinių bandymų naudojant PC (t. y. ≤ 6 mėnesių intervalais), jei tai laboratorijos, kurios reguliariai atlieka LLNA: BrdU-ELISA (t. y. atlieka LLNA: BrdU-ELISA ne rečiau kaip kartą per mėnesį) ir turi įsteigusios anksčiau sukauptų PC duomenų bazę, kuri rodo laboratorijos gebėjimą gauti atkuriamus ir tikslus rezultatus su PC. Pakankamas profesionalumas atliekant LLNA: BrdU-ELISA tyrimus gali būti sėkmingai įrodomas pastoviai gaunant teigiamus rezultatus naudojant PC ne mažiau kaip 10-ye nepriklausomų bandymų, atliktų per pagrįstą laikotarpį (t. y. trumpesnį kaip vieneri metai).
13. Lygiagreti PC visada turi būti naudojama, jei yra procedūrinių LLNA: BrdU-ELISA pakeitimų (pvz., pasikeitę parengti darbuotojai, pakeistos bandymo metodo medžiagos ir (arba) reagentai, pakeista bandymo metodo įranga, pakeistas bandomųjų gyvūnų tiekėjas), o tokie pakeitimai turi būti užregistruoti laboratorijos ataskaitose. Turi būti apsvaistytas tokių pasikeitimų poveikis anksčiau sukauptų duomenų bazės tinkamumui, vertinant būtinybę sukurti naują anksčiau sukauptų duomenų bazę, skirtą PC rezultatų nuoseklumui dokumentuoti.

14. Tyrėjai turi suprasti, kad sprendimas vykdyti PC tyrimą periodiškai, o ne nuolat, turi padarinių neigiamų tyrimų rezultatų, gautų be lygiagrečios PC naudojimo, laikotarpiu tarp kiekvieno periodinio PC tyrimo, tinkamumui ir priimtinumui. Pvz., jei, atliekant periodinį PC tyrimą, gaunamas klaidingas neigiamas rezultatas, gali būti kvestionuojami neigiami bandomosios medžiagos rezultatai, gauti laikotarpiu nuo paskutinio priimtino periodinio PC tyrimo iki nepriimtino periodinio PC tyrimo. Šių rezultatų padariniai turi būti stropiai įvertinti sprendžiant, ar nuolat vykdyti lygiagrečius, ar tik periodinius PC tyrimus. Taip pat reikia apsvarstyti galimybę lygiagrečios PC grupės tyrimams naudoti mažiau gyvūnų, jei tai moksliskai pateisinama ir jei laboratorija savo anksčiau sukauptais duomenimis įrodo, kad galima naudoti mažiau pelių (17).
15. Nors PC turi būti bandoma nešiklyje, kuris žinomai sukelia pastovų atsaką (pvz., acetono ir alyvų aliejaus mišinyje; 4:1, tūrio dalys), gali būti tam tikrų reguliavimo situacijų, kai gali prireikti ištirti ir nestandartinį nešiklį (kliniškai/chemiškai susijusį preparatą) (18). Jei lygiagreti PC bandoma kitokiame nešiklyje nei bandomoji medžiaga, turi būti naudojama atskira VC, skirta lygiagrečiai PC.
16. Tais atvejais, kai vertinamos tam tikrai cheminei klasei ar atsakų sričiai priklausančios bandomosios medžiagos, gali būti naudojamos ir palyginamosios medžiagos, kad būtų parodyta, jog bandymo metodas tinkamai veikia nustatant šių bandomųjų medžiagų odos jautrinimo potencialą. Atitinkamos palyginamosios medžiagos turi pasižymėti šiomis savybėmis:
- struktūriniu ir funkcinu panašumu į bandomosios cheminės medžiagos klasę,
 - žinomomis fizinėmis ir cheminėmis charakteristikomis,
 - apie jas turi būti patvirtinančių duomenų, gautų LLNA: BrdU-ELISA tyrimais,
 - apie jas turi būti patvirtinančių duomenų, gautų kitų gyvūnų modeliais ir (arba) iš žmonių.

BANDYMO EIGA

Gyvūnų skaičius ir dozių dydis

17. Vienai dozės grupei naudojami ne mažiau kaip keturi gyvūnai, naudojant ne mažiau kaip tris bandomosios cheminės medžiagos koncentracijas ir vieną lygiagrečią NC grupę, paveikiamą tik bandomosios medžiagos nešikliu, ir PC grupę (lygiagrečią arba naujausią, remiantis laboratorijos politika pagal 11–15 skirsnius). Reikia apsvarstyti poreikį išbandyti keletą PC dozių, ypač bandant PC periodiškai. Išskyrus neveikimą bandomąja medžiaga, kontrolinių grupių gyvūnai turi būti prižiūrimi ir jais rūpinamasi taip pat, kaip poveikio grupės gyvūnais.
18. Dozė ir nešiklis parenkami laikantis 2 ir 19 šaltiniuose pateiktųjų rekomendacijų. Paeilinės dozės paprastai parenkamos iš atitinkamos koncentracijos verčių eilės, pvz., 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ir t. t. Taikomai koncentracijos verčių eilei turi būti skirtas tinkamas loginis pagrindas. Reikia atsižvelgti į visą turimą toksikologinę informaciją (pvz., apie ūminį toksiškumą ir odos dirginimą) ir struktūrinę bei fizikinių ir cheminių savybių informaciją apie dominančią bandomąją cheminę medžiagą (ir (arba) struktūriškai panašias medžiagas), kad trys iš eilės taikomos koncentracijos vertės būtų parinktos taip, kad didžiausios koncentracijos poveikis būtų kuo didesnis, bet išvengta sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo (19) (20 ir šio priedo B.4 skyrius). Jei tokios informacijos neturima, gali prireikti pradinio atrankinio bandymo (žr. 21–24 skirsnius).
19. Nešiklis neturi kenkti ar iškraipyti bandymo rezultato ir turi būti parinktas taip, kad būtų kuo geresnis tirpumas, siekiant gauti didžiausią įmanomą koncentraciją gaminant tirpalą/suspensiją, tinkamą bandomajai medžiagai užtepti. Rekomenduojami nešikliai yra acetono ir alyvų aliejaus mišinys (4:1, tūrio dalys), N,N-dimetilformamidas, metiletiketonas, propilenglikolis ir dimetilsulfoksidas (6), tačiau galima naudoti kitus nešiklius, jei pateikiamas tinkamas loginis pagrindas. Tam tikrais atvejais papildomai kontrolei gali tekti naudoti klinikiu požiūriu atitinkantį tirpiklį arba komercinį preparatą, turintį bandomosios medžiagos. Reikia ypač stengtis užtikrinti, kad nešiklyje būtų hidrofilinių bandomųjų medžiagų, kurios drėkintų odą ir iš karto nenutekėtų, įdedant solubilizavimo priemonių (pvz., 1 % „Pluronic® L92“). Taigi reikia vengti naudoti grynai vandeninius nešiklius.
20. Apdorojant atskirų pelių limfmazgius galima įvertinti nepastovumą tarp gyvūnų ir statistiškai palyginti skirtumus tarp bandomosios medžiagos ir VC grupės matavimo rezultatų (žr. 33 skirsnį). Be to, tik tada, kai surenkami atskirų gyvūnų duomenys, realu įvertinti galimybę sumažinti pelių skaičių PC grupėje (17). Negana to, kai kurios reguliavimo institucijos reikalauja gauti atskirtų gyvūnų duomenis. Reguliarus atskirų gyvūnų duomenų rinkimas turi rūpinimosi gyvūnų gerove privalumų, nes išvengiama dvigubo bandymo, kurio reikėtų, jei bandomosios medžiagos rezultatus, iš pradžių gautus kitu būdu (pvz., iš jungtinių gyvūnų duomenų), vėliau vertintų reguliavimo institucijos, kurios vadovaujasi kitais reikalavimais (pvz., atskirų gyvūnų duomenimis).

Atrankinis bandymas

21. Jei neturima informacijos, skirtos didžiausiai bandomai dozei nustatyti (žr. 18 skirsnį), reikia atlikti atrankinį bandymą, kad būtų nustatytas tinkamas dozės lygis pagal LLNA: BrdU-ELISA metodą. Atrankinio bandymo tikslas – nustatyti gaires didžiausiam pagrindinio LLNA: BrdU-ELISA tyrimo dozės lygiui parinkti, kai neturima informacijos apie koncentraciją, kuri sukelia sisteminį toksiškumą (žr. 24 skirsnį) ir (arba) per didelę vietinį odos dirginimą (žr. 23 skirsnį). Didžiausias bandomas dozės lygis turi būti 100 % bandomosios medžiagos koncentracija, jei tai skystiai, arba didžiausia įmanoma koncentracija, jei tai kietosios medžiagos ar suspensijos.
22. Atrankinis bandymas atliekamas tokiomis pačiomis sąlygomis kaip ir pagrindinis LLNA: BrdU-ELISA tyrimas, išskyrus tai, kad nevertinama limfmazgių proliferacija ir galima tirti mažiau gyvūnų kiekvienoje dozės grupėje. Siūloma naudoti vieną arba du gyvūnus vienai dozės grupei. Visos pelės kasdien stebimos, ar poveikio vietoje nepasireiškia sisteminio toksiškumo ar vietinio dirginimo klinikiniai požymiai. Kūno masė užrašoma prieš bandymą ir prieš jį pabaigiant (6 dieną). Abi kiekvienos pelės ausys stebimos, ar nėra eritemos ir įvertinama pagal 1 lentelę (20 ir šio priedo B.4 skyrius). 1 dieną (prieš dozę), 3 dieną (praėjus maždaug 48 val. po pirmosios dozės) ir 6 dieną stormačiu (pvz., skaitmeniniu mikrometru arba ciferblatinio storio matuokliu) atliekami ausų storio matavimai. Be to, 6 dieną ausų storis gali būti įvertinamas ausų skylamušio svorio matavimais, atliekamais po to, kai gyvūnai humaniškai numarunami. Per didelį vietinį dirginimą rodo ≥ 3 edemos įvertis ir (arba) $\geq 25\%$ ausies storio padidėjimas bet kurią matavimo dieną (21) (22). Didžiausia pagrindiniam LLNA: BrdU-ELISA tyrimui parenkama dozė yra antra pagal dydį dozė iš atrankinio bandymo koncentracijų eilės (žr. 18 skirsnį), nesukelianti sisteminio toksiškumo ir (arba) per didelio vietinio odos dirginimo.

1 lentelė

Eritemos įverčiai

Pastebėjimas	Įvertis
Eritemos nėra	0
Labai nedidelė eritema (vos juntama)	1
Aiški eritema	2
Nuo vidutinės iki sunkios eritemos	3
Nuo sunkios eritemos (buroko raudonumo) iki šašo susidarymo, kuomet neįmanoma įvertinti eritemos sunkumo	4

23. Taikant LLNA metodą, dirgikliams nustatyti, be ausų storio padidėjimo 25 % (21) (22), naudojamas ir statistiškai reikšmingas paveiktų pelių ausų storio padidėjimas, palyginti su kontrolinėmis pelėmis (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Vis dėlto, nors statistiškai reikšmingas padidėjimas galimas ir ausies storiui esant mažesniai kaip 25 %, tai nėra siejama konkrečiai su per dideliu dirginimu (25) (26) (27) (28) (29).
24. Šie klinikiniai požymiai gali rodyti sisteminį toksiškumą (30), kai yra naudojami kaip integruoto įvertinimo dalis, todėl gali nurodyti didžiausią dozės lygį, skirtą pagrindiniam LLNA: BrdU-ELISA: nervų sistemos funkcijos pokyčiai (pvz., piloerekcija, ataksija, drebulys ir konvulsijos); elgsenos pokyčiai (pvz., agresyvumas, prausimosi pokyčiai, žymus aktyvumo lygio pokytis); kvėpavimo būdo pokyčiai (t. y. kvėpavimo dažnio ir intensyvumo pokyčiai, pvz., dusulys, žiopčiojimas ir karkalai) ir edalo bei vandens vartojimo pokyčiai. Be to, vertinant turi būti atsižvelgiama į letargijos ir (arba) nereagavimo požymius ir bet kokius didesnio už nedidelį ar trumpalaikį skausmą ir kančią klinikinį požymius arba $> 5\%$ kūno masės sumažėjimą nuo 1 iki 6 dienos, ir į mirtingumą. Gaištantys ar didelio skausmo ir kančios požymius rodantys gyvūnai turi būti humaniškai numarinti (31).

Pagrindinio bandymo eksperimentinis planas

25. Eksperimentinis bandymo planas atrodo taip:

- 1 diena. Atskirai nustatoma ir užrašoma kiekvieno gyvūno masė ir bet kokie klinikiniai pastebėjimai. Ant kiekvienos ausies išorinės pusės užtepama 25 μ l atitinkamai atskiesto bandomosios medžiagos tirpalo, vien tik nešiklio arba PC (lygiagrečios arba naujausios, remiantis laboratorijos politika pagal 11–15 skirsnius).
- 2 ir 3 dienos. Pakartojama 1 dieną daryta procedūra.
- 4 diena. Jokio veikimo.
- 5 diena. Intraeritonealiai suleidžiama 0,5 ml (5 mg/pelei) BrdU (10 mg/ml) tirpalo.

- 6 diena. Užrašoma kiekvieno gyvūno masė ir bet kokie klinikiniai pastebėjimai. Praėjus maždaug 24 valandoms (24 h) po BrdU injekcijos gyvūnai humaniškai numarinami. Kiekvienos pelės drenuojamieji ausų limfmazgiai išpjaujami ir kiekvieno gyvūno atskirai apdorojami fosfatiniame buferyje (PBS). Limfmazgių identifikavimo ir skrodimo aprašą bei schemas galima rasti (17) šaltinyje. Norint toliau stebėti vietinę odos atsaką pagrindiniame tyrime, į tyrimo protokolą gali būti įtraukti tokie papildomi parametrai kaip ausų eritemos įverčiai arba ausų storio matavimo rezultatai (gauti storio matuokliu arba ausų skylamušio svorio matavimais atliekant nekroskopiją).

Ląstelių suspensijos ruošimas

26. Limfmazgių ląstelių (LNC), išpjautų iš kiekvienos pelės abiejų ausų, pavienių ląstelių suspensija paruošiama švelniai mechanškai susmulkinant pro 200 µm nerūdijančio plieno tinklelį ar kitu priimtinu pavienių ląstelių suspensijos sudarymo metodu (pvz., panaudojant vienkartinį plastikinį grūstuvą limfmazgiams sutraiškyti ir prakošiant pro #70 nailoninį sietą). LNC suspensijos paruošimo procedūra šiame tyrime labai svarbi, todėl kiekvienas operatorius turi iš anksto įgyti jos įgūdžių. Kadangi NC gyvūnų limfmazgiai maži, svarbu dirbti atsargiai, kad būtų išvengta bet kokio dirbtinio poveikio SI vertėms. Kiekvienu atveju LNC suspensijos tikslinis tūris turi būti pakoreguotas iki nustatyto optimizuoto tūrio (maždaug 15 ml). Optimizuotas tūris nustatomas taip, kad būtų pasiekta 0,1–0,2 vidutinė NC grupės sugertis.

Ląstelių proliferacijos nustatymas (BrdU kiekio limfocitų DNR matavimas)

27. BrdU matuojamas ELISA metodu, naudojant komercinį rinkinį (pvz., „Roche Applied Science“, Mannheim, Vokietija, katalogo Nr. 11 647 229 001). Netrukus, 100 µl LNC suspensijos įlašinama į tris plokščiadugnės mikroplokštelės šulinėlius. Po LNC fiksacijos ir denatūracijos į kiekvieną šulinėlį įdedama antiBrdU antikūnų ir leidžiama sureaguoti. Po to antiBrdU antikūnai pašalinami išplauinant, pridėdama substrato tirpalo ir leidžiama sudaryti chromogeną. Tada išmatuojama sugertis esant 370 nm, naudojant standartinį 492 nm bangų ilgį. Visais atvejais tyrimo sąlygos turi būti optimizuotos (žr. 26 skirsnį).

STEBĖJIMAI

Klinikiniai stebėjimai

28. Kiekviena pelė kruopščiai apžiūrima bent kartą per dieną bet kokiems vietinio dirginimo užtepimo vietoje arba sisteminio toksiškumo klinikiniais požymiais nustatyti. Visi pastebėjimai apie kiekvieną pelę yra sistemingai užrašomi. Į stebėsenos planus turi būti įtraukti kriterijai, pagal kuriuos galima tuoj pat nustatyti peles, kurioms pasireiškė sisteminis toksiškumas, per didelis vietinis odos dirginimas arba odos ėsdinimas, kad gyvūnus būtų galima numarinti (31).

Kūno masė

29. Kaip nurodyta 25 skirsnyje, atskirai kiekvieno gyvūno masė išmatuojama bandymo pradžioje ir po numatyto humaniško numarino.

REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

30. Kiekvienos poveikio grupės rezultatai išreiškiami kaip vidutinis SI. SI gaunamas dalijant kiekvienos bandomosios medžiagos grupės vidutinę BrdU ženklavimo rodiklio / gyvūnui vertę ir PC grupės vidutinę BrdU ženklavimo rodiklio / gyvūnui vertę iš tirpiklio/VC grupės vidutinės BrdU ženklavimo rodiklio vertės. Taigi, VC vidutinė SI vertė lygi 1.

BrdU ženklavimo rodiklis nustatomas taip:

$$\text{BrdU ženklavimo rodiklis} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS blank}_{\text{em}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS blank}_{\text{ref}})$$

Čia: em = skleidžiamų bangų ilgis; ref = standartinis bangų ilgis.

31. Vertinant rezultatus, atsakas laikoma teigiamu, jei $SI \geq 1,6$ (10). Tačiau, sprendžiant, ar ribinis rezultatas (t. y. SI vertė yra nuo 1,6 iki 1,9) turi būti paskelbtas teigiamu, galima atsižvelgti į dozės ir atsako sąryšio stiprumą, statistinį reikšmingumą ir tirpiklio/nešiklio bei PC atsakų nuoseklumą (3) (6) (32).
32. Kai gaunamas teigiamas ribinis atsakas (SI yra nuo 1,6 iki 1,9), tyrėjai gali pageidauti įvertinti papildomą informaciją, pvz., dozės ir atsako sąryšį, sisteminio toksiškumo arba per didelio sudirginimo požymius ir, kai tinka, statistinį reikšmingumą kartu su SI vertėmis, kad patvirtintų, jog tokie rezultatai iš tiesų teigiami (10). Reikia atsižvelgti ir į įvairias bandomosios medžiagos savybes, įskaitant tai, ar jos struktūra gimininga žinomų odą jautrinančių medžiagų struktūrai, ar ji sukelia per didelį pelių odos dirginimą, ir pastebimo dozės ir atsako sąryšio tipą. Šie ir kiti aspektai yra išsamiai aptarti kitur (4).

33. Surenkant duomenis apie kiekvieną pelę galima statistiškai išanalizuoti dozės ir atsako sąryšį tuose duomenyse ir jo laipsnį. Atliekant bet kokią statistinį įvertinimą, galima įtraukti dozės ir atsako sąryšio vertinimą ir tinkamai pakoreguotus bandymo grupių palyginimus (pvz., suporuotų dozavimo grupių palyginimus su lygiagrečiomis tirpiklio/VC). Į statistinę analizę gali būti įtraukta, pvz., tiesinė regresija arba Viljamso tyrimas, skirtas dozės ir atsako sąryšio tendencijoms įvertinti, ir suporuotų rezultatų palyginimų Daneto tyrimas. Rinkdamasis tinkamą statistinės analizės metodą tyrėjas turi turėti omenyje galimus variantiškumų skirtingumus ir kitas susijusias problemas, dėl kurių gali prireikti duomenų transformacijos ar neparametrinės statistinės analizės. Bet kuriuo atveju tyrėjui gali tekti atlikti SI skaičiavimus ir statistinę analizę su tam tikrai duomenų taškais (kartais vadinamais „riktais“) ir be jų.

DUOMENYS IR ATASKAITŲ TEIKIMAS

Duomenys

34. Duomenys pateikiami lentelėse, nurodant atskirų gyvūnų BrDU ženklinimo rodiklio vertes, BrDU ženklinimo rodiklio/gyvūnui grupės vidurkis, atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM) ir kiekvienos dozės grupės vidutinis SI, palygintas su lygiagrečios tirpiklio/nešiklio grupės rodikliu.

Bandymo ataskaita

35. Bandymo ataskaitoje pateikiama ši informacija:

Bandomoji ir kontrolinė cheminės medžiagos:

- tapatumo duomenys (pvz., CAS numeris ir EC numeris, jei yra; šaltinis; grynumas; žinomos priemaišos; partijos numeris),
- fizikinė būsena ir fizikinės ir cheminės savybės (pvz., lakumas, stabilumas, tirpumas),
- jei tai mišinys – jo sudėtis ir komponentų procentinė dalis.

Tirpiklis / nešiklis:

- tapatumo duomenys (grynumas; koncentracija (jei tinka); naudojamas tūris),
- nešiklio pasirinkimo pagrindimas.

Bandomo gyvūnai:

- CBA pelių šaltinis,
- gyvūnų mikrobiologinė būsena, jei žinoma,
- gyvūnų skaičius ir amžius,
- gyvūnų šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir t. t.

Bandymo sąlygos:

- ELISA rinkinio šaltinis, partijos numeris ir gamintojo kokybės užtikrinimo/kokybės kontrolės duomenys (antikūnų jautrumas bei specifiškumas ir aptikimo riba),
- išsami informacija apie bandomosios medžiagos ruošimą ir užtepimą,
- dozės pasirinkimo pagrindimas (įskaitant atrankinio bandymo rezultatus, jei bandymas buvo daromas),
- naudotos nešiklio ir bandomosios medžiagos koncentracijos vertės, suminis užteptos medžiagos kiekis,
- išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (įskaitant pašaro tipą ar šaltinį, vandens šaltinį),
- poveikio medžiaga ir mėginių ėmimo tvarkaraščiai,
- toksiškumo matavimo metodai,

- tyrimo rezultatų vertinimo kaip teigiami arba neigiami kriterijai,
- išsami informacija apie bet kokius nukrypimus nuo protokolo ir paaiškinimas, kaip tas nukrypimas paveiks tyrimo sistemą ir rezultatus.

Patikimumo tikrinimas:

- paskutinės patikimumo patikros rezultatų santrauka, įskaitant informaciją apie medžiagą, koncentraciją ir naudojamą nešiklį,
- bandymo laboratorijoje lygiagrečiai ir (arba) anksčiau sukaupti PC ir lygiagrečiai gauti neigiamos (tirpiklio/nešiklio) kontrolės duomenys,
- jei lygiagreti PC nebuvo naudojama, naujausio periodinio PC bandymo data ir laboratorijos ataskaita ir ataskaita su laboratorijos anksčiau sukauptais PC duomenimis, pagrindžiančiais lygiagrečios PC nenaudojimą.

Rezultatai:

- atskirų pelių masė dozės gavimo ir numatyto humaniško numaravimo dieną; taip pat kiekvienos poveikio grupės vidurkis ir atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM),
- toksinio poveikio atsiradimo laikas ir požymiai, įskaitant kiekvieno gyvūno odos dirginimą medžiagos užtepimo vietoje, jei yra,
- kiekvienos poveikio grupės atskiros pelės BrdU ženklinimo rodiklių ir SI verčių lentelės,
- kiekvienos poveikio grupės BrdU ženklinimo rodikliui/pelei vidurkis ir atitinkamas paklaidos rodiklis (pvz., SD, SEM) ir kiekvienos poveikio grupės riktų analizės rezultatai,
- apskaičiuotas SI ir atitinkamas variantiškumo matas, kuriuo atsižvelgiama į atskirų gyvūnų rezultatų variantiškumą tiek bandomosios medžiagos, tiek kontrolinėje grupėse,
- dozės ir atsako sąryšis,
- statistinė analizė, jei tinka.

Rezultatų aptarimas:

- trumpas rezultatų, dozės ir atsako sąryšio analizės ir statistinės analizės, jei tinka, paaiškinimas, padarant išvadą, ar bandomoji medžiaga turi būti laikoma odos jautrikliau.

NUORODOS

- (1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<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. Available at: [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. Available at: [<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. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPrept2009.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. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreesen, 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. Available at: [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. Available at: [<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. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fdLLNA/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. Available at: [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. Available at: [<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 priedėlis

APIBRĖŽTYS

Tikslumas – bandymo metodo rezultatų ir patvirtintų pamatinių verčių artumas. Tikslumas yra bandymo metodo naudojimo charakteristikų matas ir vienas iš tinkamumo aspektų. Terminas dažnai vartojamas kaip lygiavertis terminui „sutapimas“ ir reiškia tinkamų bandymo metodo rezultatų dalį (33).

Palyginamoji medžiaga – jautrinanti arba nejautrinanti medžiaga, naudojama kaip bandomosios medžiagos palyginimo standartas. Palyginamoji medžiaga turi pasižymėti tokiomis savybėmis: i) pastoviu (-iais) ir patikimu (-ais) šaltiniu (-iais), ii) struktūriniu ir funkcinu panašumu į bandomų medžiagų klasę, iii) žinomomis fizikinėmis ir cheminėmis charakteristikomis, iv) patvirtinančiais duomenimis apie žinomus poveikius ir v) žinomu potencialu norimų atsakų intervale.

Klaidingai neigiamas rezultatas – bandymo metodu bandomoji medžiaga neteisingai įvertinta kaip neigiama arba neaktyvi, nors iš tiesų yra teigiama arba aktyvi (33).

Klaidingai teigiamas rezultatas – bandymu bandomoji medžiaga neteisingai įvertinta kaip teigiama arba aktyvi, nors iš tiesų yra neigiama arba neaktyvi (33).

Pavojus – neigiamo poveikio sveikatai arba ekologiškai galimybė. Neigiamas poveikis pasireiškia tik tada, jei veikimas medžiaga yra pakankamo lygio.

Atkuriamumas tarp laboratorijų – laipsnio, kuriuo skirtingos kvalifikuotos laboratorijos, taikydamos tą patį protokolą ir bandančios tas pačias bandomąsias medžiagas, gali gauti kokybiškai ir kiekybiškai panašius rezultatus, matas. Atkuriamumas tarp laboratorijų nustatomas atliekant pradinio tinkamumo patvirtinimo ir tinkamumo pavirtinimo procesus ir rodo laipsnį, kuriuo bandymą galima sėkmingai perkelti tarp laboratorijų; tai dar vadinama tarplaboratoriniu atkuriamumu (33).

Atkuriamumas laboratorijoje – laipsnis, kuriuo kvalifikuoti darbuotojai toje pačioje laboratorijoje gali sėkmingai atkartoti rezultatus, taikydami konkretų protokolą skirtingu metu, matas. Dar vadinamas laboratoriniu atkuriamumu (33).

Riktas – pastebėjimas, kad vertė labai skiriasi nuo kitų atsitiktinio populiacijos ėminio verčių.

Kokybės užtikrinimas – valdymo procesas, per kurį asmenys, nepriklausomi nuo atliekančiųjų bandymus, įvertina, kaip laboratorija laikosi bandymo standartų, reikalavimų ir užrašų saugojimo procedūrų bei duomenų perdavimo tikslumo.

Patikimumas – juo įvertinamas laipsnis, kuriuo bandymo metodas gali būti ilgainiui atkartojamai atliekamas vienoje ir skirtingose laboratorijose, taikant tą patį protokolą. Jis įvertinamas skaičiuojant atkuriamumą laboratorijoje ir tarp laboratorijų (33).

Odos jautrinimas – imunologinis procesas, vykstantis paveiktą individą išoriškai paveikus cheminiu alergenu, kuris sukelia odos imuninį atsaką, dėl kurio gali atsirasti kontaktinis jautrinimas.

Dirginimo rodiklis (angl. SI) – vertė, apskaičiuojama bandomosios medžiagos jautrinimo potencialui įvertinti – tai yra paveiktų grupių proliferacijos sąryšio su lygiagrečios nešiklio kontrolinės grupės proliferacija koeficientas.

Bandomoji medžiaga (dar vadinama bandomąja chemine medžiaga) – bet kuri medžiaga ar mišinys, bandomi taikant šį bandymų metodą.“
