

II

(Nezakonodajni akti)

UREDBE

UREDBA KOMISIJE (EU) 2019/1390

z dne 31. julija 2019

o spremembi Priloge k Uredbi (ES) št. 440/2008 o določitvi testnih metod v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) zaradi njene prilagoditve tehničnemu napredku

(Besedilo velja za EGP)

EVROPSKA KOMISIJA JE –

ob upoštevanju Pogodbe o delovanju Evropske unije,

ob upoštevanju Uredbe (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 18. decembra 2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) ter o ustanovitvi Evropske agencije za kemikalije in o spremembi Direktive 1999/45/ES ter o razveljavitvi Uredbe Sveta (EGS) št. 793/93 in Uredbe Komisije (ES) št. 1488/94 ter Direktive Sveta 76/769/EGS in direktiv Komisije 91/155/EGS, 93/67/EGS, 93/105/ES in 2000/21/ES ⁽¹⁾ ter zlasti člena 13(2) Uredbe,

ob upoštevanju naslednjega:

- (1) Uredba Komisije (ES) št. 440/2008 ⁽²⁾ vsebuje preskusne metode za ugotavljanje fizikalno-kemijskih lastnosti, toksičnosti in ekotoksičnosti kemikalij, ki se uporabljajo za namene Uredbe (ES) št. 1907/2006.
- (2) Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD) razvija harmonizirane in mednarodno dogovorjene smernice za preskušanje kemikalij za regulativne namene. OECD redno izdaja nove in revidirane smernice za preskušanje ob upoštevanju znanstvenega napredka na tem področju.
- (3) Da bi se upošteval tehnični napredek in bi se, kjer je to mogoče, v skladu s členom 13(2) Uredbe (ES) št. 1907/2006 zmanjšalo število živali, ki se uporabljajo za poskuse, bi bilo treba po sprejetju ustreznih smernic OECD za preskušanje določiti dve novi preskusni metodi za oceno ekotoksičnosti in devet novih preskusnih metod za ugotavljanje toksičnosti za zdravje ljudi ter posodobiti sedem preskusnih metod. Enajst od navedenih preskusnih metod se nanaša na preskuse in vitro za draženje kože in oči/jedkost za kožo in oči, preobčutljivost kože, genotoksičnost in endokrine učinke. O predlagani spremembi so bila opravljena posvetovanja z deležniki.

⁽¹⁾ UL L 396, 30.12.2006, str. 1.

⁽²⁾ Uredba Komisije (ES) št. 440/2008 z dne 30. maja 2008 o določitvi testnih metod v skladu z Uredbo (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) (UL L 142, 31.5.2008, str. 1).

- (4) Uredbo (ES) št. 440/2008 bi bilo zato treba ustrezno spremeniti.
- (5) Ukrepi iz te uredbe so v skladu z mnenjem odbora, ustanovljenega v skladu s členom 133 Uredbe (ES) št. 1907/2006 –

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

Člen 1

Priloga k Uredbi (ES) št. 440/2008 se spremeni v skladu s Prilogo k tej uredbi.

Člen 2

Ta uredba začne veljati dvajseti dan po objavi v *Uradnem listu Evropske unije*.

Ta uredba je v celoti zavezujoča in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.

V Bruslju, 31. julija 2019

Za Komisijo
Predsednik
Jean-Claude JUNCKER

PRILOGA

Priloga k Uredbi (ES) št. 440/2008 se spremeni:

- (1) Poglavje B.4 dela B se nadomesti z naslednjim:

„B.4 AKUTNO DRAŽENJE KOŽE/JEDKOST ZA KOŽO

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 404 (2015). Smernice OECD za preskušanje kemikalij se redno preverjajo, s čimer se zagotovi, da izražajo najboljša razpoložljiva znanstvena spoznanja. Pri preverjanju Smernice OECD za preskušanje 404 je bila posebna pozornost namenjena možnim izboljšavam v zvezi s pomisleki glede dobrobiti živali in ocenjevanju vseh obstoječih podatkov o preskusni kemikaliji, da bi se izognili nepotrebnim testiranjem na laboratorijskih živalih. Posodobljena različica Smernice OECD za preskušanje 404 (prvotno sprejeta leta 1981, revidirana v letih 1992, 2002 in 2015) vključuje sklic na dokument s smernicami za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)) v zvezi z draženjem kože/jedkostjo za kožo (1), pri čemer je predlagan modularen pristop k preskušanju draženja kože in jedkosti za kožo. S pristopi IATA se opisuje več modulov, v katerih so zbrani viri informacij in orodja za analizo, ter (i) zagotavljajo smernice o tem, kako obstoječe podatke, pridobljene s preskušanjem, in podatke, ki ne temeljijo na preskušanju, združiti in uporabiti pri ocenjevanju potenciala kemikalij za draženje kože in jedkost za kožo, poleg tega je (ii) predlagan pristop, kadar je potrebno dodatno preskušanje (1). Poleg tega je v navedeni smernici, kjer je to potrebno, namesto sočasne priporočena zaporedna namestitev treh preskusnih obličev na žival v začetnem preskusu *in vivo*.
2. Opredelitvi pojmov draženje kože in jedkost za kožo sta navedeni v dodatku k tej preskusni metodi.

ZAČETNI PREUDARKI

3. Za znanstveno zanesljivost in dobrobit živali je koristno, da se preskusi *in vivo* začnejo izvajati šele, ko se z analizo, ki temelji na zanesljivosti dokazov, kot je predstavljena v dokumentu s smernicami za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju v zvezi z draženjem kože in jedkostjo za kožo, tj. v vseh treh delih teh smernic in njihovih ustreznih modulih (1), ocenijo vsi razpoložljivi podatki, ki se nanašajo na potencial preskusne kemikalije za draženje kože/jedkost za kožo. Na kratko, v prvem delu se obstoječi podatki obravnavajo na podlagi sedmih modulov, ki zajemajo podatke za ljudi, podatke *in vivo*, podatke *in vitro*, podatke o fizikalno-kemijskih lastnostih (npr. vrednost pH, zlasti močna kislost ali alkalnost) in nepreskusne metode. V drugem delu se opravi analiza, ki temelji na zanesljivosti dokazov. Če ta analiza še vedno ni prepričljiva, je treba tretji del izvesti z dodatnim preskušanjem, pri čemer se začne z metodami *in vitro*, preskušanje *in vivo* pa se uporabi kot zadnja možnost. S to analizo bi se morala torej zmanjšati potreba po *in vivo* preskušanju jedkosti za kožo/draženja kože v zvezi s preskusnimi kemikalijami, za katere je glede navedenih dveh končnih točk na voljo že dovolj dokazov iz drugih študij.

NAČELO PRESKUSA IN VIVO

4. Preskusna kemikalija, ki jo je treba preskusiti, se nanese na kožo preskusne živali v enkratnem odmerku; netretirane površine kože preskusne živali služijo za kontrolo. Stopnja dražilnosti/jedkosti se odčita in evidentira v določenih intervalih in nadalje opiše, da se vsi učinki celovito ocenijo. Študija mora trajati dovolj dolgo, da se oceni popravljivost ali nepopravljivost opaženih učinkov.
5. Živali, ki v kateri koli fazi preskusa kažejo trajne znake hudega trpljenja in/ali bolečine, je treba humano usmrtiti, preskusno kemikalijo pa oceniti skladno s tem. Merila za sprejetje odločitve o humani usmrtitvi umirajočih in hudo trpečih živali so navedena v ločenem dokumentu s smernicami (2).

PRIPRAVA ZA PRESKUS IN VIVO

Izbira živalskih vrst

6. Kunec beličnik je najbolj zaželena laboratorijska žival; uporabljajo se zdravi mladi odrasli kunci. Uporabo drugih vrst je treba obrazložiti.

Priprava živali

7. Približno 24 ur pred začetkom preskusa je treba živalim skrbno ostriči dlako s hrbtnega dela trupa. Paziti je treba, da se koža ne odrgne, in uporabiti le živali z zdravo, nepoškodovano kožo.
8. Nekateri kunčji sevi imajo goste zaplate dlak, ki so bolj izrazite v nekaterih obdobjih med letom. Takšni predeli goste rasti dlak se ne smejo uporabiti kot preskusni predeli.

Pogoji nastanitve in hranjenja

9. Živali morajo biti nastanjene posamično. Temperatura v prostoru s poskusnimi živalmi mora biti za kunce 20 °C ($\pm$ 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 30-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporabi običajna predpisana laboratorijska prehrana z neomejeno količino pitne vode.

PRESKUSNI POSTOPEK

Nanašanje preskusne kemikalije

10. Preskusno kemikalijo je treba nanesti na del površine kože (približno 6 cm²) in pokriti z obližem iz gaze, ki se pritrdi z nedražilnim trakom. Kadar neposredna aplikacija ni mogoča (npr. tekoče snovi ali nekatere kašnate zmesi), je treba preskusno kemikalijo najprej nanesti na obliž iz gaze, ki se nato uporabi na koži. Obliž mora biti v ohlapnem stiku s kožo, pritrjen z ustrezno napol zapiralno obvezo med trajanjem izpostavitve. Če se preskusna kemikalija nanese na obliž, jo je treba pritrditi na kožo tako, da je stik dober in preskusna kemikalija enakomerno razporejena po koži. Živali je treba preprečiti dostop do obliža in zaužitje ali vdihavanje preskusne kemikalije.
11. Tekoče preskusne kemikalije se običajno uporabljajo nerazredčene. Kadar se preskušajo trdne snovi (ki jih je mogoče zdrobiti, če je to po presoji potrebno), je treba preskusno kemikalijo navlažiti z zelo majhno količino vode (ali, kadar je potrebno, z drugim ustreznim vehiklom), ki zadostuje za zagotavljanje dobrega stika s kožo. Kadar se uporabljajo drugi vehikli, ne voda, mora biti možen vpliv vehikla na dražilnost kože zaradi preskusne kemikalije minimalen, če sploh obstaja.
12. Na koncu obdobja izpostavljenosti, ki traja običajno 4 ure, je treba z uporabo vode ali ustreznega topila odstraniti preostalo preskusno kemikalijo, kjer je to izvedljivo, ne da bi se spremenil obstoječi odziv ali integriteta epidermisa.

Velikost odmerka

13. Na preskusni predel se nanese odmerek 0,5 ml tekoče snovi ali 0,5 g trdne snovi ali kašnate zmesi.

Začetni preskus (*in vivo* preskus draženja kože/jedkosti za kožo z uporabo ene živali)

14. Kadar se presodi, da je preskusna kemikalija jedka, dražilna ali nerazvrščena, na podlagi analiz, ki temeljijo na zanesljivosti dokazov, ali predhodnega preskušanja *in vitro*, običajno ni potrebno dodatno preskušanje *in vivo*. Kadar se kljub temu zdi potrebno zagotoviti dodatne podatke, se izvede preskus *in vivo* z uporabo ene živali in na podlagi naslednjega pristopa. Na žival se zaporedoma nanesejo do trije preskusni obliži. Prvi obliž se odstrani po treh minutah. Če ni opažena nobena resna reakcija kože, se na drug predel nanese drugi obliž in se odstrani po eni uri. Če opazovanja v tej fazi pokažejo, da se lahko humano dopusti podaljšanje izpostavljenosti na štiri ure, se nanese še tretji obliž in se odstrani po štirih urah, odziv pa se razvrsti po stopnjah.
15. Če se opazi jedeček učinek po kateri koli izmed teh treh zaporednih izpostavitve, se preskus nemudoma zaključi. Če se jedeček učinek ne opazi po tem, ko se odstrani zadnji obliž, se žival opazuje 14 dni, razen če se jedkost razvije prej.
16. Kadar se ne pričakuje, da bo preskusna kemikalija povzročila jedkost, vendar bi lahko bila dražilna, je treba nanesti le en obliž na eno žival za štiri ure.

Potrditveni preskus (*in vivo* preskus draženja kože z dodatnimi živalmi)

17. Če se jedeček učinek v začetnem preskusu ne opazi, je treba dražilni ali negativni odziv potrditi z uporabo do dveh dodatnih živali, s po enim obližem za vsako, v obdobju izpostavitve štirih ur. Če se v začetnem preskusu opazi dražilni učinek, se potrditveni preskus lahko izvede zaporedoma ali s sočasno izpostavitvijo dveh dodatnih živali. Izjemoma, ko se začetni preskus ne izvede, se lahko dve ali tri živali tretirajo le z enim obližem, ki se odstrani po štirih urah. Kadar se uporabljata dve živali, ni potrebno dodatno preskušanje, če obe kažeta enak odziv. V nasprotnem primeru se preskusi tudi tretja žival. Dvoumne odzive je morda treba oceniti z uporabo dodatnih živali.

Obdobje opazovanja

18. Obdobje opazovanja mora biti dovolj dolgo, da se lahko v celoti ovrednoti popravljivost opaženih učinkov. Preskus je treba zaključiti, kadar koli žival pokaže znake hude bolečine ali trpljenja. Za določitev povračljivosti učinkov je treba živali opazovati 14 dni po odstranitvi obližev. Če se povračljivost opazi pred 14. dnem, je treba preskus zaključiti takrat.

Klinična opazovanja in razvrščanje kožnih reakcij v stopnje

19. Pri vseh živalih je treba preveriti znake rdečine in edemov ter odzive evidentirati po 60 minutah ter nato po 24, 48 in 72 urah po odstranitvi obliža. Pri začetnih preskusih na eni živali se preskusni predel preveri tudi takoj po odstranitvi obliža. Kožne reakcije se razvrstijo v stopnje in evidentirajo v skladu s stopnjami iz spodnje tabele. Če po 72 urah nastane poškodba kože, ki je ni mogoče opredeliti kot dražilnost ali jedkost, so morda potrebna opazovanja do 14. dne, da se opredeli povračljivost učinkov. Poleg opazovanja dražilnosti je treba v celoti opisati in evidentirati vse lokalne toksične učinke, npr. tanjšanje kože, in vse sistemske nasprotno učinke (npr. učinke na klinične znake toksičnosti in telesno težo). Za razjasnitev dvoumnih odzivov je morda treba opraviti histopatološki pregled.
20. Razvrščanje kožnih odzivov je nujno subjektivno. Da bi se izboljšala usklajenost pri določanju stopnje kožnega odziva ter bi se preskuševalnim laboratorijem in vsem sodelujočim pomagalo pri oblikovanju in razlagi rezultatov opazovanj, mora biti osebje, ki izvaja ta opazovanja, ustrezno usposobljeno za uporabo sistema določanja stopnje (glej tabelo spodaj). Pri tem bi lahko bil v pomoč ilustriran priročnik za določanje stopnje dražilnosti kože in drugih lezij (3).

PODATKI IN POROČANJE

21. Rezultate študije je treba v obliki preglednice povzeti v končnem poročilu o preskusu, zajemati pa morajo vse postavke s seznama v odstavku 24.

Vrednotenje rezultatov

22. Rezultate draženja kože je treba vrednotiti v povezavi z vrsto in resnostjo lezij ter njihovo povračljivostjo ali nepovračljivostjo. Posamezni rezultati ne pomenijo absolutnega standarda za dražilne lastnosti materiala, ker se ocenjujejo tudi drugi učinki preskusnega materiala. Pač pa je treba posamezne rezultate obravnavati kot referenčne vrednosti, ki jih je treba vrednotiti v povezavi z vsemi drugimi opažanji iz študije.
23. Pri oceni dražilnih odzivov je treba upoštevati povračljivost kožnih lezij. Kadar so odzivi, npr. alopecija (omejen predel), hiperkeratoza, hiperplazija in luščenje, vidni do konca 14-dnevnega obdobja opazovanja, je treba preskusno kemikalijo obravnavati kot dražilno.

Poročilo o preskusu

24. Poročilo o preskusu mora vsebovati informacije, navedene v nadaljevanju.

Utemeljitev preskusa in vivo:

- analiza, ki temelji na zanesljivosti dokazov in se nanaša na obstoječe preskusne podatke, vključno z rezultati strategije zaporednega preskušanja;
- opis pomembnih podatkov, ki so na voljo iz prejšnjih preskušanj;
- podatki, pridobljeni v vsaki fazi strategije preskušanja;
- opis izvedenih preskusov *in vitro*, vključno s podrobnimi podatki o postopkih, rezultati, dobljenimi s preskusnimi/referenčnimi snovmi;
- analiza, ki temelji na zanesljivosti dokazov, za izvedbo študije *in vivo*.

Preskusna kemikalija:

- snov iz ene sestavine: kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- snov z več sestavinami, zmes in snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali (UVCB): čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin;
- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- vir, številka serije, če je na voljo;
- obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);

- stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan;
- pogoji skladiščenja.

Vehikel:

- identifikacija, koncentracija (kjer je ustrezno), uporabljena količina;
- utemeljitev izbire vehikla.

Preskusne živali:

- uporabljena vrsta/sev, obrazložitev za uporabo živali, če to ni kunec belčnik;
- število živali po spolu;
- teža posamezne živali ob začetku in zaključku preskusa;
- starost na začetku študije;
- izvor živali, nastanitvene razmere, prehrana itd.

Preskusni pogoji:

- tehnika priprave območja nanosa obliža;
- podrobnosti o uporabljenih materialih ter tehniki priprave in nanosa obliža,
- podrobnosti o pripravi, nanosu in odstranitvi preskusne kemikalije.

Rezultati:

- preglednica doseženih rezultatov odziva na dražilnost/jedkost za vsako žival na vseh izmerjenih časovnih točkah;
- opis vseh opaženih lezij;
- podroben opis vrste in stopnje opažene dražilnosti ali jedkosti in morebitne histopatološke ugotovitve;
- opis drugih neželenih lokalnih (npr. tanjšanje kože) in sistemskih učinkov poleg dražilnosti kože ali jedkosti za kožo.

Obravnava rezultatov

Sklepne ugotovitve

VIRI

- (1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 203), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (2) OECD (1998). Usklajen celostni sistem razvrstitve kemijskih snovi glede na nevarnosti za zdravje ljudi in vplive na okolje, kot sta ga novembra 1998 na 28. skupnem zasedanju potrdila Odbor za kemikalije in Delovna skupine za kemikalije.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 19), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

*Preglednica***RAzvrščanje Kožnih Reakcij v Stopnje****Nastanek rdečine in krast**

Rdečine ni.....	0
Neznatna rdečina (komajda opazna).....	1
Zelo razločna rdečina.....	2
Zmerna do resna rdečina.....	3
Resna rdečina (goveja rdečina) in nastanek krast, ki ovira razvrstitev rdečine.....	4

Najvišja možna stopnja: 4

Tvorba kožnih edemov

Kožnih edemov ni.....	0
Neznaten kožni edem (komajda opazen).....	1
Rahel edem (robovi predela dobro vidni, ker so izbočeni).....	2
Zmeren kožni edem (izbočen približno 1 mm).....	3
Resen kožni edem (izbočen več kakor 1 mm in razširjen zunaj predela izpostavitve).....	4

Najvišja možna stopnja: 4

Za razjasnitev dvoumnih odzivov se lahko opravi histopatološki pregled.

Dodatek

OPREDELITVE POJMOV

Kemikalija je snov ali zmes.

Draženje kože je nastanek povračljive poškodbe kože po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure.

Jedkost za kožo je nastanek nepovračljivih poškodb kože, zlasti vidnega odmiranja prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure. Za reakcije jedkosti so značilne razjede, krvavitve, krvave hraste in do konca 14-dnevnega opazovanja izguba barve zaradi beljenja kože, celi predeli alopecije in brazgotine. Dvournne lezije je morda treba preiskati histopatološko.

Preskusna kemikalija je vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.“

(2) Poglavje B.17 dela B se nadomesti z naslednjim:

„B.17 IN VITRO PRESKUSI GENSKIH MUTACIJ V CELICAH SESALCEV Z UPORABO GENOV HPRT IN XPRT

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 476 (2016). Preskusne metode se redno preverjajo ob upoštevanju znanstvenega napredka, spreminjajočih se regulativnih zahtev in dobrobiti živali. V tej revidirani različici preskusne metode B.17 se upoštevajo skoraj tridesetletne izkušnje s tem preskusom, pa tudi rezultati razvijanja ločene nove metode za *in vitro* preskuse genskih mutacij v celicah sesalcev z uporabo gena za timidin kinazo. Preskusna metoda B.17 je del sklopa preskusnih metod v zvezi z genetsko toksikologijo. OECD je pripravila dokument z jedrnatimi informacijami o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregledom nedavnih sprememb smernic OECD za preskušanje v zvezi z genetsko toksikologijo (1).
2. Namen *in vitro* preskusa genskih mutacij v celicah sesalcev je zaznati genske mutacije, katerih nastanek povzročajo kemikalije. S celičnimi linijami, uporabljenimi pri teh preskusih, se merijo napredne mutacije na poročevalskih genih, natančneje endogenem genu za hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferazo (Hprt v celicah glodavcev, HPRT v človeških celicah; pri tej preskusni metodi v nadaljnjem besedilu skupaj: gen Hprt in preskus HPRT) in transgenu za ksantin-gvanin-fosforibozil-transferazo (gpt) (v nadaljnjem besedilu: preskus XPRT). S preskusi mutacij HPRT in XPRT se zaznajo različne vrste genskih pojavov. Poleg mutacijskih pojavov, zaznanih s preskusom HPRT (npr. substitucije baznih parov, premiki bralnega okvira, majhne delecije in insercije), lahko lokacija transgena gpt na avtosomih omogoči zaznavo mutacij, ki so posledica obsežnih delecij, in morebitne mitotične rekombinacije, ki se ne zazna s preskusom HPRT, ker je gen Hprt na kromosomu X (2) (3) (4) (5) (6) (7). Preskus XPRT se za regulativne namene trenutno uporablja manj pogosto kot preskus HPRT.
3. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

4. Pri preskusih, izvedenih *in vitro*, je običajno treba uporabiti zunanji vir presnovne aktivacije. Zunanji sistem presnovne aktivacije ne posnema pogojev *in vivo* v celoti.
5. Paziti je treba, da se izogibamo pogojem, ki bi vodili do lažno pozitivnih rezultatov (tj. morebitnemu medsebojnemu delovanju s preskusnim sistemom), ki jih ne bi povzročilo neposredno medsebojno delovanje preskusnih kemikalij in genetskega materiala celice; med take pogoje spadajo spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti (8) (9) (10), medsebojno delovanje s sestavinami gojišča (11) (12) ali previsoke ravni citotoksičnosti (13). Za citotoksičnost, ki presega priporočene najvišje ravni citotoksičnosti, kot so opredeljene v odstavku 19, se šteje, da je prevelika za preskus HPRT.
6. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.

NAČELO PRESKUSA

7. Mutirane celice brez aktivnosti encima Hprt pri preskusu HPRT ali aktivnosti encima xprt pri preskusu XPRT so odporne proti citostatskim učinkom analoga purina 6-tiogvanina (TG). Celice s Hprt (pri preskusu HPRT) ali gpt (pri preskusu XPRT) so občutljive za TG, ki zavira celično presnovo in ustavi celično delitev. Mutirane celice so tako sposobne množitve v navzočnosti TG, medtem ko normalne celice, ki vsebujejo encim Hprt (pri preskusu HPRT) ali gpt (pri preskusu XPRT), niso.

8. Celice v suspenziji ali enoplastni kulturi se za ustrezno obdobje (3–6 ur) izpostavijo preskusni kemikaliji, in sicer z zunanjim virom presnovne aktivacije (glej odstavek 14) in brez njega, nato pa se kultivirajo na novem gojišču, da se določi citotoksičnost in omogoči izražanje fenotipa pred selekcijo mutant (14) (15) (16) (17). Citotoksičnost se določi glede na relativno preživetje, tj. učinkovitost tvorbe klonov, izmerjeno takoj po tretiranju in prilagojeno glede na morebitno izgubo celic med tretiranjem v primerjavi z negativno kontrolo (odstavek 18 in Dodatek 2). Tretirane kulture se vzdržujejo v gojišču dovolj dolgo obdobje, ki je značilno za vsako vrsto celic, da se omogoči skoraj optimalno izražanje fenotipa induciranih mutacij (običajno najmanj 7–9 dni). Po izražanju fenotipa se pogostnost mutant določi z nasaditvijo znanega števila celic v gojišče s selektivno snovjo, da se zaznajo mutirane kolonije, in v gojišče brez selektivne snovi, da se določi učinkovitost tvorbe klonov (viabilnost). Po ustrezno dolgi inkubaciji se preštejejo kolonije. Pogostnost mutant se izračuna iz števila mutiranih kolonij, korigiranega z učinkovitostjo tvorbe klonov ob selekciji mutant.

OPIS METODE

Pripravki

Celice

9. Vrste celic, uporabljene pri preskusih HPRT in XPRT, morajo imeti dokazano občutljivost za kemične mutagene, veliko učinkovitost tvorbe klonov, stabilen kariotip in stabilno pogostnost spontanega mutant. Med najpogostejše uporabljenimi celicami za preskus HPRT so linije celic kitajskega hrčka CHO, CHL in V79, celice limfoma miši L5178Y in človeške limfoblastoidne celice TK6 (18) (19). Pri preskusu XPRT se uporabljajo celice AS52, pridobljene iz CHO, ki vsebujejo transgen gpt (in v katerih je izbrisan gen Hprt) (20) (21); preskusa HPRT ni mogoče izvesti s celicami AS52, ker je bil gen hprt izbrisan. Uporaba drugih celičnih linij mora biti utemeljena in validirana.
10. Redno je treba preverjati, ali je modalno kromosomsko število v celičnih linijah stabilno in ali te linije niso okužene z mikoplazmo (22) (23); celice se ne smejo uporabljati, če so okužene ali če se je spremenilo modalno kromosomsko število. Določiti je treba običajno trajanje celičnega cikla, uporabljenega v preskuševalnem laboratoriju, ki mora biti skladno z objavljenimi lastnostmi celic. Preveriti je treba tudi pogostnost spontanega mutant v zalogi matičnih celic, pri čemer se zaloga ne sme uporabiti, če pogostnost mutant ni sprejemljiva.
11. Pred uporabo pri tem preskusu je iz kultur morda treba odstraniti že obstoječe mutirane celice, npr. z gojenjem v gojišču HAT za preskus HPRT in MPA za preskus XPRT (5) (24) (glej Dodatek 1). Očiščene celice se lahko shranijo z zamrzovanjem in nato odtalijo, da se uporabijo kot delovne zaloge. Novoodtaljena delovna zaloga se lahko uporabi za preskus, ko so doseženi običajni podvojitveni časi. Pri izvajanju preskusa XPRT je treba pri rutinskem gojenju celic AS52 uporabiti pogoje, ki zagotavljajo vzdrževanje transgena gpt (20).

Gojišča in pogoji kultiviranja

12. Za vzdrževanje kultur je treba uporabiti ustrezno gojišče in pogoje inkubacije (posode za gojenje, vlažno ozračje s 5 % CO₂ in temperatura inkubacije 37 °C). Celične kulture je treba vedno vzdrževati v pogojih, ki zagotavljajo njihovo rast v logaritemski fazi. Posebno pomembno je, da se izberejo takšna gojišča in pogoji kultiviranja, ki zagotavljajo optimalno rast celic v času izražanja in optimalno učinkovitost tvorbe klonov mutiranih, pa tudi nemutiranih celic.

Priprava kultur

13. Celične linije se namnožijo iz osnovnih kultur ter nasadijo v gojišče tako na gosto, da celice v suspenzijah ali monosloju med obdobji tretiranja in izražanja še naprej eksponentno rastejo (npr. pri celicah, ki rastejo v monosloju, se je treba izogibati konfluenci).

Presnovna aktivacija

14. Pri uporabi celic, ki nimajo ustrezne notranje sposobnosti presnavljanja, je treba uporabiti zunanje presnovne sisteme. Najpogostejše uporabljeni sistem, ki je priporočen kot privzet, razen če ni drugače utemeljeno, je s kofaktorjem dopolnjena postmitohondrijska frakcija (S9), pripravljena iz jeter glodavcev (običajno podgan), ki so bila obdelana s sredstvi za encimsko indukcijo, kot je Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28), ali z mešanico fenobarbitala in β -naftoflavona (29) (30) (31) (32). Zadnjenavedena mešanica ni v nasprotju s Stockholmsko konvencijo o obstojnih organskih onesnaževalih (33) ter se je v primerjavi s sredstvom Aroclor 1254 izkazala kot enako učinkovita za povzročanje oksidaz z mešano funkcijo (29) (31). Frakcija S9 se v končnem preskusnem gojišču običajno uporablja v koncentracijah, ki se gibljejo v razponu od 1 do 2 vol. %, lahko pa se poveča na 10 vol. %. Na izbiro vrste in koncentracije zunanega sistema presnovne aktivacije ali sredstva za indukcijo presnove lahko vpliva razred snovi, ki se preskušajo (34) (35) (36).

Priprava preskusne kemikalije

15. Trdne preskusne kemikalije je treba pred tretiranjem celic pripraviti v ustreznih topilih in razredčiti, če je to ustrezno (glej odstavek 16). Tekoče preskusne kemikalije se lahko dodajo neposredno v preskusni sistem in/ali razredčijo pred tretiranjem preskusnega sistema. Plinaste ali hlapne preskusne kemikalije je treba preskusiti z ustrezno prilagojenimi standardnimi protokoli, kot je tretiranje v zatesnjenih posodah za gojenje (37) (38). Preskusne kemikalije je treba pripraviti tik pred tretiranjem, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

PRESKUSNI POGOJI

Topila

16. Izbrati je treba tako topilo, ki optimira topnost preskusne kemikalije in ne vpliva negativno na izvedbo preskusa, npr. ne spremeni rasti celic, ne vpliva na celovitost preskusne kemikalije, ne reagira s posodami za gojenje, ne ovira sistema presnovne aktivacije. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila (ali gojišča). Zelo uveljavljeni topili sta na primer voda ali dimetil sulfoksid. Organska topila v končnem obdelovalnem gojišču v splošnem ne smejo presegati 1 vol. %, vodna topila (fiziološka raztopina ali voda) pa ne 10 vol. %. Če uporabljena topila niso uveljavljena (npr. etanol ali aceton), je treba njihovo uporabo podpreti s podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost s preskusnimi kemikalijami in preskusnim sistemom ter neobstoje genotoksičnosti pri uporabljeni koncentraciji. Če takšnih podpornih podatkov ni, je treba dodati netretirane kontrole (glej Dodatek 1), ki dokazujejo, da izbrano topilo ne povzroča škodljivih ali mutagenih učinkov.

Merjenje citotoksičnosti in izbiranje koncentracij izpostavljenosti

17. Pri določanju najvišje koncentracije preskusne kemikalije se je treba izogibati koncentracijam, pri katerih se lahko pojavijo lažni pozitivni odzivi, kot so tisti, ki povzročajo preveliko citotoksičnost (glej odstavek 20), obarjanje v gojiščih (glej odstavek 21) ali znatne spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti (glej odstavek 5). Če preskusna kemikalija ob dodajanju povzroči znatno spremembo vrednosti pH v gojišču, se lahko vrednost pH prilagodi z dodajanjem pufru v končno obdelovalno gojišče, da se preprečijo lažni pozitivni rezultati in vzdržujejo ustrezni pogoji kultiviranja.
18. Izbira koncentracije temelji na citotoksičnosti in drugih preudarkih (glej odstavke 20–22). Čeprav je lahko koristno, da se zaradi boljšega določanja koncentracij, ki jih je treba uporabiti v glavnem preskusu, citotoksičnost oceni v začetnem preskusu, ta preskus ni obvezen. Tudi če se izvede začetna ocena citotoksičnosti, je treba pri glavnem preskusu še vedno izmeriti citotoksičnost vsake kulture. Oceniti jo je treba na podlagi relativnega preživetja, tj. učinkovitosti tvorbe klonov celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, prilagojeni z morebitno izgubo celic med tretiranjem na podlagi štetja celic, v primerjavi s prilagojeno učinkovitostjo tvorbe klonov pri negativnih kontrolah (ki se jim pripiše 100-odstotno preživetje) (za formulo glej Dodatek 2).

19. Oceniti je treba vsaj štiri preskusne koncentracije (v kar niso vključeni topilo in pozitivne kontrole), ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (ustrezna citotoksičnost, število celic itd.). Čeprav je priporočljiva uporaba podvojenih kultur, se lahko pri vsaki preskušeni koncentraciji uporabi ponovljeni vzorec kulture ali le ena sama tretirana kultura. Rezultate, pridobljene pri neodvisnih ponovljenih vzorcih kultur za zadevno koncentracijo, je treba navesti ločeno, vendar se lahko za podatkovno analizo združijo (17). Za preskusne kemikalije, ki kažejo malo ali nič citotoksičnosti, so ustrezni približno 2- do 3-kratni intervali med koncentracijami. V primeru citotoksičnosti morajo izbrane preskusne koncentracije zajemati območje od koncentracije, ki povzroča citotoksičnost, do koncentracij, pri katerih je citotoksičnost zmerna oziroma majhna ali je ni. Pri številnih preskusnih kemikalijah so vidne strme krivulje odziva na koncentracijo, zato je za zajem celotnega območja citotoksičnosti ali podrobno preučitev razmerja med koncentracijo in odzivom morda treba uporabiti večje število koncentracij, ki so tesno skupaj, in več kot štiri koncentracije, zlasti kadar je treba poskus ponoviti (glej odstavke 43). Uporaba več kot štirih koncentracij je lahko še zlasti pomembna, če se uporabi ena sama kultura.
20. Če največja koncentracija temelji na citotoksičnosti, si je treba pri najvišji koncentraciji prizadevati za od 20- do 10-odstotno relativno preživetje. Pazljivost je potrebna pri razlagi pozitivnih rezultatov, dobljenih samo pri 10-odstotnem ali manjšem relativnem preživetju (odstavek 43).
21. Pri slabo topnih preskusnih kemikalijah, ki pri koncentracijah, nižjih od najnižje netopne koncentracije, niso citotoksične, mora najvišja analizirana koncentracija ob koncu tretiranja s preskusno kemikalijo povzročiti nastanek motnosti ali oborine, ki je vidna s prostim očesom ali pod invertnim mikroskopom. Tudi če se citotoksičnost pojavi nad najnižjo netopno koncentracijo, je priporočljivo, da se preskusi le pri eni koncentraciji, ki povzroči nastanek motnosti ali vidne oborine, saj lahko oborina povzroči lažne učinke. Pri koncentraciji, ki povzroči nastanek oborine, je treba paziti, da oborina ne vpliva na izvedbo preskusa. Koristno je lahko, če se pred preskusom določi topnost v gojišču.
22. Če oborina ni vidna ali ni opažene mejne citotoksičnosti, mora najvišja preskusna koncentracija ustrezati 10 mM, 2 mg/ml ali 2 µl/ml, pri čemer se upošteva najnižja od teh koncentracij (39) (40). Če preskusna kemikalija nima določene sestave, kot so snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali (tj. kemijske snovi z neznano ali spremenljivo sestavo (UVCB)) (41), okoljski ekstrakti itd., je v primeru odsotnosti ustrezne citotoksičnosti morda treba povečati najvišjo koncentracijo (npr. 5 mg/ml), da bi se povečala koncentracija vsake posamezne sestavine. Vendar je treba opozoriti, da se lahko pri zdravih za uporabo v humani medicini te zahteve razlikujejo (42).

Kontrole

23. Za vsak preskusni pogoj je treba vključiti sočasne negativne kontrole (glej odstavke 16), sestavljene le iz topila v obdelovalnem gojišču in obdelane enako kot kulture za tretiranje.
24. Sočasne pozitivne kontrole so potrebne, da se dokažeta zmožnost laboratorija, da odkrije mutagene pod pogoji uporabljenega preskusnega protokola, in učinkovitost zunanega sistema presnovne aktivacije, če je ustrezno. Primeri pozitivnih kontrol so navedeni v preglednici 1. Za pozitivno kontrolo se lahko uporabijo tudi druge snovi, če je to utemeljeno. Ker so *in vitro* preskusi genotoksičnosti za celice sesalcev dovolj standardizirani, se lahko preskusi, pri katerih se uporablja tretiranje z zunanjim sistemom presnovne aktivacije in brez njega, izvedejo tudi samo s pozitivno kontrolo, pri kateri je potrebna presnovna aktivacija. V tem primeru en sam odziv pri pozitivni kontroli dokaže tako dejavnost sistema presnovne aktivacije kot tudi odzivnost preskusnega sistema. Vsako pozitivno kontrolo je treba uporabiti pri eni ali več koncentracijah, pri katerih se pričakuje obnovljivo in zaznavno povečanje glede na ozadje, da se dokaže občutljivost preskusnega sistema, odziva pa ne sme ogroziti citotoksičnost, ki bi preseгла meje, določene za to preskusno metodo (glej odstavke 20).

Preglednica 1

Referenčne snovi, ki se priporočajo za ocenjevanje usposobljenosti laboratorija in izbor pozitivne kontrole

Stanje presnovne aktivacije	Lokus	Snov in št. CAS
Ni zunanje presnovne aktivacije	<i>Hprt</i>	Etilmetansulfonat [št. CAS 62-50-0] Etilnitrozourea [št. CAS 759-73-9] 4-nitrokvinolin 1- oksid [št. CAS 56-57-5]
	<i>xprt</i>	Streptonigrin [št. CAS 3930-19-6] Mitomicin C [št. CAS 50-07-7]
Zunanja presnovna aktivacija	<i>Hprt</i>	3-metilkolantren [št. CAS 56-49-5] 7,12-dimetilbenzantracen [št. CAS 57-97-6] Benzo[a]piren [št. CAS 50-32-8]
	<i>xprt</i>	Benzo[a]piren [št. CAS 50-32-8]

POSTOPEK

Tretiranje s preskusno kemikalijo

25. Množice se celice se tretirajo s preskusno kemikalijo v prisotnosti in odsotnosti sistema presnovne aktivacije. Čas izpostavljenosti naj bo ustrezno dolg (navadno je ustrezno 3–6 ur).
26. Najmanjše število celic, ki se za vsako preskusno kulturo (kontrolno in tretirano) uporabijo v vsaki fazi preskusa, mora temeljiti na pogostnosti spontanega mutant. Splošno vodilo je, da se tretira in pasajira dovolj celic, da se v vseh fazah preskusa v vsaki kulturi vzdržuje 10 spontanega mutant (17). Pogostnost spontanega mutant običajno znaša med 5×10^{-6} in 20×10^{-6} . Za pogostnost spontanega mutant 5×10^{-6} in vzdrževanje zadostnega števila spontanega mutant (10 ali več) tudi za kulture, tretirane pri koncentracijah, ki povzročijo 90-odstotno citotoksičnost med tretiranjem (10-odstotno relativno preživetje), bi bilo treba tretirati vsaj 20×10^{-6} celic. Poleg tega je treba v obdobju izražanja kultivirati in nasaditi na ploščo zadostno število celic (vendar nikoli manj kot 2 milijona) za selekcijo mutant (17).

Čas izražanja fenotipa in merjenje pogostnosti mutant

27. Po obdobju tretiranja se celice kultivirajo, da se omogoči izražanje fenotipa mutant. Najmanj 7–9 dni običajno zadostuje za skoraj optimalno izražanje fenotipa na novo induciranih mutant *Hprt* in *xprt* (43) (44). V tem obdobju se celice redno kultivirajo v novem gojišču, da se vzdržujejo v fazi eksponentne rasti. Po izražanju fenotipa se celice znova nasadijo v gojišče s selektivno snovjo (6-tiogvanin) in gojišče brez take snovi, da se določita število mutant oziroma učinkovitost tvorbe klonov ob selekciji. Za to nasaditev se lahko uporabijo posode za monoslojne kulture ali mikrotitrne plošče za celice v suspenziji. Za selekcijo mutant je treba celice nasaditi tako na gosto, da se zagotovi optimalna pridobitev mutant (tj. da se prepreči metabolično sodelovanje) (17). Plošče se inkubirajo primerno dolgo za optimalno rast kolonije (npr. 7–12 dni), kolonije pa se preštejejo. Pogostnost mutant se izračuna iz števila mutiranih kolonij, korigiranega z učinkovitostjo tvorbe klonov ob selekciji mutant (za formule glej Dodatek 2).

Usposobljenost laboratorija

28. Preden se začne laboratorij uporabljati za rutinsko preskušanje, mora izvesti sklop preskusov z referenčnimi pozitivnimi snovmi, ki delujejo z različnimi mehanizmi (vsaj ena aktivna s presnovno aktivacijo in ena aktivna brez nje, pri čemer sta snovi izbrani med snovmi s seznama v preglednici 1) in različnimi negativnimi kontrolami (z uporabo različnih topil/vehiklov), s čimer dokaže, da ima zadostne izkušnje s preskusom. Ti odzivi pozitivnih in negativnih kontrol morajo biti skladni z viri. To ne velja za laboratorije, ki imajo izkušnje, tj. ki imajo na voljo zbirko podatkov iz preteklih preskusov, kot je opredeljena v odstavkih od 30 do 33.
29. Izbor snovi za pozitivno kontrolo (glej preglednico 1 v odstavku 25) je treba preiskati brez presnovne aktivacije in ob presnovni aktivaciji, da se dokažejo usposobljenost za zaznavanje mutagenih kemikalij in določanje učinkovitosti sistema presnovne aktivacije, ustreznost pogojev za rast celic med tretiranjem fenotipa in selekcijo mutant ter ustreznost postopkov štetja. Izbrati je treba območje koncentracij izbranih kemikalij, kar omogoča ponovljiva in s koncentracijo povezana povečanja glede na ozadje, da se pokažeta občutljivost in dinamično območje preskusnega sistema.

Podatki o kontrolah iz preteklih preskusov

30. Laboratorij mora določiti:
- območje in porazdelitev pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov ter
 - območje in porazdelitev negativnih kontrol (netretirane, topilo) iz preteklih preskusov.
31. Ko se podatki za porazdelitev negativnih kontrol iz preteklih preskusov pridobivajo prvič, morajo biti sočasne negativne kontrole skladne z objavljenimi podatki o kontrolah (22). Ko se k porazdelitvi kontrol dodaja več podatkov o preskusu, sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo presegati 95-odstotne kontrolne meje za navedeno porazdelitev (17) (45) (46).
32. Zbirka podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov mora sprva temeljiti na vsaj 10 preskusih, po možnosti pa mora biti sestavljena iz vsaj 20 preskusov, izvedenih v primerljivih preskusnih pogojih. Laboratoriji morajo uporabljati metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali karte ‚X-črta‘ (47)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah, ter pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju ‚pod nadzorom‘ (46). Nadaljnja priporočila o načinu oblikovanja in uporabe podatkov iz preteklih preskusov (npr. merila za vključitev podatkov med podatke iz preteklih preskusov in njihovo izključitev iz teh podatkov ter merila za sprejemljivost za zadevni poskus) so navedena v virih (45).
33. V podatke o negativnih kontrolah je treba vključiti pogostnost mutant iz ene kulture ali po možnosti ponovljenih vzorcev kulture, kot je opisano v odstavku 23. Sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo presegati 95-odstotne kontrolne meje porazdelitve iz zbirke podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (17) (45) (46). Kadar podatki o sočasni negativni kontroli presežejo 95-odstotno kontrolno mejo, jih je sprejemljivo vključiti v porazdelitev kontrol iz preteklih preskusov, če ti podatki niso izjemni osamelci ter če obstaja dokaz, da je preskusni sistem ‚pod nadzorom‘ (glej zgoraj), in dokaz o odsotnosti tehničnih ali človeških napak.
34. Vsako spremembo v protokolu preskusa je treba preučiti glede na skladnost z obstoječimi zbirkami podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Če se pojavijo večje neskladnosti, je treba ustvariti novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov.

PODATKI IN POROČANJE

Predstavitev rezultatov

35. V predstavitev rezultatov je treba vključiti vse podatke, potrebne za izračun citotoksičnosti (izražene kot relativno preživetje). Podatki za tretirane in kontrolne kulture morajo vključevati število celic ob koncu tretiranja, število celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, in število kolonij (ali število jamic brez kolonij pri metodi z mikrotitrsko ploščo). Relativno preživetje za vsako kulturo je treba izraziti kot delež glede na hkratno kontrolo s topilom (za opredelitve pojmov glej Dodatek 1).
36. V predstavitev rezultatov je treba vključiti tudi vse podatke, potrebne za izračun pogostnosti mutant. Podatki za tretirane in kontrolne kulture morajo vključevati: (1) število celic, nasajenih na ploščo s selektivno snovjo in brez take snovi (ob nasaditvi celic na ploščo za selekcijo mutant), ter (2) število prešteti kolonij (ali število jamic brez kolonij pri metodi z mikrotitrsko ploščo) na ploščah s selektivno snovjo in brez take snovi. Pogostnost mutant se izračuna iz števila mutiranih kolonij (na ploščah s selektivno snovjo), korigiranega z učinkovitostjo tvorbe klonov (s plošč brez selektivne snovi). Pogostnost mutant je treba izraziti kot število mutiranih celic na milijon viabilnih celic (za opredelitve pojmov glej Dodatek 1).
37. Navesti je treba podatke za posamezne kulture. Poleg tega je treba vse podatke povzeti v obliki preglednice.

Merila za sprejemljivost

38. Sprejemljivost preskusa temelji na merilih, navedenih v nadaljevanju.
- Šteje se, da je sočasna negativna kontrola sprejemljiva za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, kot je opisano v odstavku 33.
 - Sočasne pozitivne kontrole (glej odstavek 24) morajo povzročiti odzive, skladne z odzivi iz zbirke podatkov o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo.
 - Preskušena sta bila dva preskusna pogoja (tj. s presnovno aktivacijo in brez nje), razen če so pri enem nastali pozitivni rezultati (glej odstavek 25).
 - Analizirati je mogoče ustrezno število celic in koncentracij (odstavki 25, 26 in 19).
 - Merila za izbor najvišje koncentracije so skladna z merili, opisanimi v odstavkih 20, 21 in 22.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

39. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje kot jasno pozitivna, če se v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev:
- pri vsaj eni od preskusnih koncentracij pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
 - pojavi povečanje, povezano s koncentracijo, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;

- pojavijo rezultati zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 33).

Ko so izpolnjena vsa ta merila, se nato šteje, da lahko preskusna kemikalija povzroči nastanek genskih mutacij v kultiviranih celicah sesalcev v tem preskusnem sistemu. Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena v virih (46) (48).

40. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če se v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev:

- pri nobeni od preskusnih koncentracij ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- ne pojavi povečanje, povezano s koncentracijo, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;
- vsi rezultati nahajajo znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 33).

Nato se šteje, da preskusna kemikalija ne more povzročiti nastanka genskih mutacij v kultiviranih celicah sesalcev v tem preskusnem sistemu.

41. Preverjanje jasno pozitivnega ali jasno negativnega odziva ni potrebno.

42. Če odziv ni niti jasno negativen niti jasno pozitiven, kot je opisano zgoraj, ali za podporo pri ugotavljanju biološke pomembnosti rezultatov je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami. Izvedba ponovitve poskusa je lahko koristna, po možnosti z uporabo spremenjenih preskusnih pogojev (npr. razmik med koncentracijami, drugi pogoji za presnovno aktivacijo (tj. koncentracija ali izvor S9)).

43. Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih. Zato je treba zaključiti, da je odziv na preskusno kemikalijo dvoumen (kar pomeni, da je enako verjetno pozitiven ali negativen).

Poročilo o preskusu

44. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija:

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;
- meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

— Snov iz ene sestavine

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;

kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

— Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

— čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Topilo:

— utemeljitev izbire topila;

— delež topila v končnem gojišču.

Celice:

za laboratorijske izvirne kulture:

— vrsta, izvor celičnih linij;

— število pasaž, če je na voljo, in pretekli rezultati v laboratoriju;

— lastnosti kariotipa in/ali modalno število kromosomov;

— metode vzdrževanja celičnih kultur;

— odsotnost mikoplazem;

— podvojitveni čas celic.

Preskusni pogoji:

— razlogi za izbiro koncentracij in števila kultur, vključno z npr. podatki o citotoksičnosti in mejami topnosti;

— sestava gojišča, koncentracija CO₂, stopnja vlažnosti;

— koncentracija preskusne kemikalije, izražena kot končna koncentracija v gojišču (npr. v µg ali mg/ml ali mM gojišča);

- koncentracija (in/ali količina) topila in preskusne kemikalije, ki se dodata v gojišče;
- temperatura inkubacije;
- čas inkubacije;
- trajanje tretiranja;
- gostota celic med tretiranjem;
- vrsta in sestava sistema presnovne aktivacije (vir S9, način priprave zmesi S9, koncentracija ali količina zmesi S9 in S9 v končnem gojišču, nadzor kakovosti S9); snovi pozitivne in negativne kontrole, končne koncentracije za vsak pogoj tretiranja;
- dolžina časa izražanja (skupaj s številom nasajenih celic ter programom kultiviranja na novem gojišču in dodajanja hranil, če je to primerno);
- identiteta selektivne snovi in njena koncentracija;
- merila za sprejemljivost preskusov;
- uporabljene metode za določanje števila viabilnih in mutiranih celic;
- uporabljene metode za merjenje citotoksičnosti;
- vsi dodatni podatki, pomembni za citotoksičnost in uporabljeno metodo;
- trajanje inkubacije po nasaditvi na ploščo;
- merila za obravnavanje študij kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih;
- uporabljene metode za določitev vrednosti pH, osmolarnosti in obarjanja.

Rezultati:

- število tretiranih celic in število celic, kultiviranih na novem gojišču, za vsako kulturo;
- meritve citotoksičnosti in morebitna druga opažanja;
- znaki obarjanja in čas odkritja;

- število celic, nasajenih v selektivno in neselektivno gojišče;
- število kolonij v neselektivnem gojišču in število odpornih kolonij v selektivnem gojišču ter s tem povezani pogostnosti mutant;
- razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;
- podatki o sočasnih negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah (koncentracije in topila);
- podatki o negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, razponi, srednje vrednosti in standardni odkloni ter interval zaupanja (npr. 95 %), pa tudi število podatkov;
- statistične analize (za posamezne kulture in združene ponovljene vzorce, če je ustrezno) in p-vrednosti, če obstajajo.

Razprava o rezultatih

Sklepna ugotovitev

VIRI

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.
- (2) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J., in Tindall, K. R. (ur.). (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (3) Chu, E. H. Y., in Malling, H. V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., ZDA, 61, 1306–1312.
- (4) Moore, M. M., Harrington-Brock, K., Doerr, C. L., in Dearfield, K. L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagen. Res.*, 4, 394–403.
- (5) Aaron, C. S., in Stankowski, L. F., Jr. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. *Mutation Res.*, 223, 121–128.
- (6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, L., Theiss, J., in Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, 235–239.
- (7) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H., in Wasson, J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. *Mutation Res.*, 196, 17–36.
- (8) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J., in Myhr, B. C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147–204.

-
- (9) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I., in Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, 297-305.
- (10) Brusick, D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.
- (11) Nessler, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I., in Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutation Res.*, 49, 439-452.
- (12) Long, L. H., Kirkland, D., Whitwell, J., in Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634, 177-183.
- (13) Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L., in Müller, L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. *Mutation Res.*, 5841-256.
- (14) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F., Jr., in Yang, L. L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutation Res.*, 189, 135-141.
- (15) Liber, H. L., Yandell, D. W., in Little, J. B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutation Res.*, 216, 9-17.
- (16) Stankowski, L. F., Jr., Tindall, K. R., in Hsie, A. W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133-147.
- (17) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B., in Asquith, J. C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. V: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D. J. (ur.). Cambridge University Press, str. 66-101.
- (18) Hsie, A. W., Casciano, D. A., Couch, D. B., Krahn, D. F., O'Neill, J. P., in Whitfield, B. L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 86, 193-214.
- (19) Li, A. P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, *Mutation Res.*, 85, 165-175.
- (20) Tindall, K. R., Stankowski, L. F., Jr., Machanoff, R., in Hsie, A. W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2gpt-Transformed Cells, *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1411-1415.
- (21) Hsie, A. W., Recio, L., Katz, D. S., Lee, C. Q., Wagner, M., in Schenley, R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. *Proc Natl Acad Sci.*, 83(24): 9616-9620.

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

- (35) O'Neill, J. P., Machanoff, R., San Sebastian, J. R., in Hsie, A. W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. *Environ. Mol. Mutation.*, 4, 7–18.
- (36) Li, A. P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Mol. Mutation*, 4, 7-18.
- (37) Krahn, D. F., Barsky, F. C., in McCooey, K. T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. V: Tice, R. R., Costa, D. L., in Schaich, K. M. (ur.). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, str. 91–103.
- (38) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P., in Brooks, A. L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5, 795–801.
- (39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (smernice za preskušanje 473, 476 in 487). Na voljo na zahtevo pri Organizaciji za gospodarsko sodelovanje in razvoj.
- (40) Brookmire, L., Chen, J. J., in Levy, D. D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, *Environ. Mol. Mutation*, 54, 36-43.
- (41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,
- (42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Na voljo na: [<https://federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (43) O'Neill, J. P., in Hsie, A. W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguanine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), *Mutation, Res.*, 59, 109–118.
- (44) Chiewchanwit, T., Ma, H., El Zein, R., Hallberg, L., in Au, W. W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. *Mutation, Res.*, 1335(2):121–8.
- (45) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J., in Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation, Res.*, 723, 87–90.
- (46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment* (št. 199), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (47) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O., in Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. V: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D. J. (ur.). Cambridge University Press, Cambridge, str. 141–154.
- (48) Fleiss, J. L., Levin, B., in Paik, M. C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3. izdaja, New York: John Wiley & Sons.

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Mutageni substitucije baznih parov: kemikalije, ki povzročijo zamenjavo baznih parov v DNK.

Kemikalija: snov ali zmes.

Učinkovitost tvorbe klonov: delež celic, nasajenih na ploščo pri nizki gostoti in sposobnih zrasti v kolonijo, ki jo je mogoče prešteti.

Koncentracije: se nanašajo na končne koncentracije preskusne kemikalije v gojišču.

Citotoksičnost: za poskuse, zajete v to preskusno metodo, je citotoksičnost opredeljena kot zmanjšanje relativnega preživetja tretiranih celic v primerjavi z negativnimi kontrolami (glej zadevni odstavek).

Napredna mutacija: genska mutacija starševskega tipa mutirane oblike, ki povzroči spremembo ali izgubo encimskega delovanja ali funkcije kodiranega proteina.

Mutageni premika bralnega okvira: kemikalije, ki povzročijo adicijo ali delecijo enega ali več baznih parov v molekuli DNK.

Genotoksično: splošni izraz, ki zajema vse poškodbe DNK ali kromosomov, vključno s prelomi DNK, prerazporeditvijo aduktov, mutacijami, aberacijami kromosomov in aneuploidijo. Vsi genotoksični učinki ne vplivajo na nastanek mutacij ali trajnih kromosomskih poškodb.

Gojišče HAT: gojišče, ki vsebuje hipoksantin, aminopterin in timidin ter se uporablja za čiščenje mutant Hprt.

Mitotična rekombinacija: med mitozo rekombinacija med homolognimi kromatidi, ki lahko povzroči indukcijo prelomov dvojne vijačnice DNK ali izgubo heterozigotnosti.

Gojišče MPA: gojišče, ki vsebuje ksantin, adenin, timidin, aminopterin in mikofenolno kislino ter se uporablja za čiščenje mutant Xprt.

Mutageno: povzroča dedno spremembo zaporedij baznih parov DNK v genih ali strukture kromosomov (kromosomske aberacije).

Pogostnost mutant: število opaženih mutiranih kolonij, deljeno s številom celic, nasajenih na ploščah v selektivnem gojišču, korigirano z učinkovitostjo tvorbe klonov (ali viabilnostjo) ob selekciji.

Čas izražanja fenotipa: čas po tretiranju, v katerem je gensko spreminjanje fiksirano znotraj genoma, vsi morebitni predhodno obstoječi genski produkti pa so odstranjeni, tako da se spremeni fenotipska lastnost.

Relativno preživetje: relativno preživetje se uporablja kot merilo za citotoksičnost, povezano s tretiranjem. Pomeni učinkovitost tvorbe klonov celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, prilagojeno z morebitno izgubo celic med tretiranjem, v primerjavi z učinkovitostjo tvorbe klonov pri negativnih kontrolah (ki se jim pripiše 100-odstotno preživetje).

Frakcije S9, pripravljene iz jeter: supernatant iz homogenata jeter po centrifugiranju pri 9 000 g, tj. izvleček surovih jeter.

Mešanica S9: mešanica frakcije S9, pripravljene iz jeter, in kofaktorjev, potrebnih za dejavnosti presnovnih encimov.

Kontrola s topilom: splošni pojem za opredelitev kontrolnih kultur, ki prejmejo samo topilo, uporabljeno za raztopitev preskusne kemikalije.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Netretirana kontrola: kulture, ki se ne tretirajo (tj. niti s preskusno kemikalijo niti s topilom), temveč se sočasno obdelujejo enako kot kulture, v katere se doda preskusna kemikalija.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti in biološki materiali.

Dodatek 2

FORMULE ZA OCENO CITOTOKSIČNOSTI IN POGOSTNOSTI MUTANT

Citotoksičnost se oceni z relativnim preživetjem, tj. učinkovitostjo tvorbe klonov (CE) celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, prilagojeno z morebitno izgubo celic med tretiranjem, v primerjavi s prilagojeno učinkovitostjo tvorbe klonov pri negativnih kontrolah (ki se jim pripiše 100-odstotno preživetje) (glej formulo za relativno preživetje (RS) v nadaljevanju).

Prilagojena učinkovitost tvorbe klonov za kulturo, tretirano s preskusno kemikalijo, se izračuna kot:

$$\text{prilagojena CE} = \frac{\text{število celic na koncu tretiranja}}{\text{število celic na začetku tretiranja}}$$

Relativno preživetje za kulturo, tretirano s preskusno kemikalijo, se izračuna kot:

$$\text{RS} = \frac{\text{prilagojena CE za tretirano kulturo}}{\text{prilagojena CE za kontrolo s topilom}} \times 100$$

Pogostnost mutant je učinkovitost tvorbe klonov v mutiranih kolonijah v selektivnem gojišču, deljena z učinkovitostjo tvorbe klonov v neselektivnem gojišču, ob selekciji izmerjeno za isto kulturo.

$$\text{pogostnost mutant} = \frac{\text{učinkovitost tvorbe klonov v mutiranih kolonijah v selektivnem gojišču}}{\text{učinkovitost tvorbe klonov v neselektivnem gojišču}}$$

Kadar se za učinkovitost tvorbe klonov uporabljajo plošče:

učinkovitost tvorbe klonov = število kolonij/število celic, nasajenih na ploščo.

Kadar se za učinkovitost tvorbe klonov uporabljajo mikrotitrne plošče:

število kolonij na vsako jamico na mikrotitrskih ploščah sledi Poissonovi porazdelitvi.

Učinkovitost tvorbe klonov = $-\text{LnP}(0)$ /število celic, nasajenih na ploščo, na jamico

Kjer je $-\text{LnP}(0)$ verjetno število praznih jamic med nasajenimi celicami, opisano z naslednjo formulo

$\text{LnP}(0) = -\text{Ln}(\text{število praznih jamic}/\text{število nasajenih jamic})$

(3) Poglavje B.22 dela B se nadomesti z naslednjim:

„B.22 PRESKUS DOMINANTNE SMRTNOSTI NA GLODAVCIH

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 478 (2016). Preskusne metode se redno preverjajo ob upoštevanju znanstvenega napredka, spreminjajočih se regulativnih zahtev in preudarkov v zvezi z dobrobitjo živali. Pri tej spremenjeni različici preskusne metode se upoštevajo več kot tridesetletne izkušnje s tem preskusom ter možnosti za združevanje ali kombiniranje tega preskusa z drugimi preskusi toksičnosti, kot sta razvojna in reprodukcijska toksičnost, ali študijami genotoksičnosti; vendar ta preskus zaradi svojih omejitev in uporabe velikega števila živali ni namenjen temu, da bi se uporabljal kot glavna metoda, temveč kot dopolnilna preskusna metoda, ki se lahko uporabi samo, kadar ni druge možnosti glede na regulativne zahteve. S kombiniranjem preskušanja toksičnosti bi bilo mogoče velikemu številu živali priznati z uporabo v preskusih toksičnosti. OECD je pripravila dokument z jedrnatimi informacijami o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregledom nedavnih sprememb smernic OECD za preskušanje v zvezi z genetsko toksikologijo (1).
2. Namen preskusa dominantne smrtnosti je raziskati, ali kemikalije povzročajo mutacije, ki so posledica kromosomskih aberacij v zarodnih celicah. Poleg tega je preskus dominantne smrtnosti primeren za ocenjevanje genotoksičnosti, saj so pri tem aktivni dejavniki metabolizma *in vivo*, farmakokinetike in popravljanja DNK, ki prispevajo k odzivu, čeprav se lahko med posameznimi vrstami razlikujejo. Indukcija dominantne smrtnosti po izpostavljenosti preskusni kemikaliji kaže, da kemikalija deluje na zarodno tkivo preskusne živali.
3. Dominantne smrtnostne mutacije povzročajo embrionalno ali fetalno smrt. Indukcija dominantne smrtnostne mutacije po izpostavljenosti preskusni kemikaliji kaže, da je kemikalija vplivala na zarodne celice preskusne živali.
4. Poskus dominantne smrtnosti je koristen za potrditev pozitivnih rezultatov preskusov s somatskimi končnimi točkami *in vivo* ter je ustrezna končna točka za napoved nevarnosti za ljudi in tveganje genskih bolezni, ki se prenašajo prek zarodne linije. Vendar je za ta preskus potrebnih veliko živali in je delovno intenziven; posledično je njegova izvedba zelo draga in zamudna. Ker je spontana pogostnost dominantnih smrtnih mutacij precej visoka, je občutljivost preskusa za zaznavo majhnih povečanj pogostnosti mutacij na splošno omejena.
5. Opredelitve ključnih pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI

6. Preskus se najpogosteje izvaja na miših (2) (3) (4), vendar so lahko v nekaterih primerih primerne tudi druge vrste, kot so podgane (5) (6) (7) (8), če je to znanstveno utemeljeno. Dominantne smrtnosti so običajno posledica velikih kromosomskih aberacij (strukturne in numerične anomalije) (9) (10) (11), vendar genskih mutacij ni mogoče izključiti. Dominantna smrtna mutacija je mutacija, ki nastane v sami zarodni celici ali se po oploditvi fiksira v zgodnjem zarodku in ne povzroči nepravilnega delovanja gamete, vendar je smrtonosna za oplojeno jajčece ali razvijajoči se zarodek.
7. Posamezni samci se v ustreznih časovnih presledkih zaporedno parijo s samicami, ki se še niso parile. Število parjenj po tretiranju je odvisno od glavnega namena študije dominantne smrtnosti (odstavek 23) in mora zagotavljati, da se za dominantne smrtnosti ocenijo vse faze zorenja moške zarodne celice (12).
8. Če obstajajo dokazi, da preskusna kemikalija ali njeni metaboliti ne bodo dosegli moda, ta preskus ni primeren.

NAČELO PRESKUSA

9. Na splošno se samci izpostavijo preskusni kemikaliji z ustreznim načinom izpostavljenosti in pariyo z netretiranimi samicami, ki se še niso parile. Z zaporednimi intervali parjenja se lahko preskušajo različne vrste zarodnih celic. Po parjenju se samice po ustreznem času evtanazirajo, njihove maternice pa se pregledajo, da se določi število ugnezditev ter živih in mrtvih zarodkov. Dominantna smrtnost preskusne kemikalije se določi s primerjavo živih ugnezditev na samico v tretirani skupini z živimi ugnezditvami na samico v kontrolni skupini z vehiklom/topilom. Porast števila mrtvih ugnezditev na samico v tretirani skupini nad število mrtvih ugnezditev na samico v kontrolni skupini kaže na izgubo po ugnezditvi, povzročeno s preskusno kemikalijo. Izguba po ugnezditvi se izračuna z določitvijo razmerja med mrtvimi ugnezditvami in skupnim številom ugnezditev v tretirani skupini v primerjavi z razmerjem med mrtvimi ugnezditvami in skupnim številom ugnezditev v kontrolni skupini. Izguba pred ugnezditvijo se lahko oceni s primerjavo števila rumenih teles, od katerega se odšteje skupno število ugnezditev, ali skupnega števila ugnezditev na samico v tretirani in kontrolni skupini.

PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

10. Usposobljenost za ta poskus je treba dokazati tako, da se pokaže sposobnost za ponovitev pogostnosti dominantne smrtnosti iz objavljenih podatkov (npr. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) s snovmi za pozitivno kontrolo (vključno z blagimi odzivi), kot so tiste iz preglednice 1, in kontrolami z vehiklom, pri čemer se dobijo pogostnosti iz negativnih kontrol, ki so v skladu s sprejemljivim razponom podatkov (glej vire zgoraj) ali s porazdelitvijo kontrol iz preteklih preskusov laboratorija, če je na voljo.

OPIS METODE

Pripravki*Izbira živalskih vrst*

11. Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve zdravih spolno zrelih živali. Običajno se uporabljajo miši, primerne pa so lahko tudi podgane. Uporabi se lahko katera koli druga ustrežna vrsta sesalcev, če je to v poročilu znanstveno utemeljeno.

Pogoji nastanitve in hranjenja živali

12. Pri glodavcih mora biti temperatura v prostoru s poskusnimi živalmi 22 °C ($\pm$ 3 °C). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 40-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne mešanice preskusne kemikalije, kadar se daje na ta način. Pred tretiranjem ali parjenjem je treba glodavce nastaniti v majhnih skupinah (ne več kot pet na kletko), tako da so razporejeni glede na spol, če agresivno vedenje ni pričakovano ali opaženo, in tretirano skupino, in sicer po možnosti v kletke s trdimi tlemi z ustrežno okoljsko obogatitvijo. Živali so lahko nastanjene posamično le, če je to znanstveno utemeljeno.

Priprava živali

13. Zdravi in spolno zreli odrasli samci in samice se naključno dodelijo kontrolni in tretirani skupini. Posamezne živali se označijo z edinstvenimi oznakami s humano, čim manj invazivno metodo (npr. z namestitvijo obročkov ali trakov, z vsaditvijo mikročipa ali biometrično identifikacijo, ne pa z zarezovanjem ušesa in prsta) ter se vsaj pet dni prilagajajo laboratorijskim pogojem. Kletke je treba razporediti tako, da se čim bolj zmanjšajo morebitni učinki, ki nastanejo zaradi razporeditve kletk. Izogibati se je treba navzkrižni kontaminaciji s pozitivno kontrolo in preskusno kemikalijo. Ob začetku študije mora biti razlika med težami živali čim manjša in ne sme presegati $\pm$ 20 % srednje vrednosti teže za vsak spol.

Priprava odmerkov

14. Trdne preskusne kemikalije je treba raztopiti ali suspendirati v ustreznih topilih ali vehiklih ali primešati hrani ali pitni vodi, preden se odmerijo živalim. Tekoče preskusne kemikalije se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Pri izpostavljenosti z vdihavanjem se lahko preskusne kemikalije glede na svoje fizikalno-kemijske lastnosti dajejo v obliki plina, pare ali trdnega/tekočega aerosola. Uporabiti je treba sveže pripravljene preskusne kemikalije, razen če je iz podatkov o stabilnosti razvidno, da je shranjevanje sprejemljivo, in so v njih opredeljeni ustrezni pogoji shranjevanja.

Preskusni pogoji*Topilo/vehikel*

15. Topilo/vehikel ne sme imeti toksičnih učinkov pri uporabljenih odmerkih in ne sme zbudati suma, da lahko kemično reagira s preskusno kemikalijo. Če se uporabijo druga, manj znana topila/vehikli, je treba njihovo uporabo podpreti z referenčnimi podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila/vehikla. Primeri pogosto uporabljenih, združljivih topil/vehiklov so voda, fiziološka raztopina, raztopina metilceluloze, raztopina natrijeve soli karboksimetil celuloze, oljčno olje in koruzno olje.

Pozitivne kontrole

16. Vedno je treba uporabiti živali za sočasne pozitivne kontrole, razen če je laboratorij dokazal usposobljenost za izvedbo preskusa in je v zadnjem času preskus redno uporabljal (npr. v zadnjih petih letih). Vendar živali za pozitivne kontrole ni treba tretirati enako kot živali, ki prejmejo preskusno kemikalijo, niti ni treba vzorčiti vseh intervalov parjenja. Za snovi za pozitivno kontrolo mora biti znano, da povzročajo dominantne smrtnosti v pogojih, uporabljenih pri preskusu. Z živalmi v kontrolnih skupinah je treba ravnati enako kot z živalmi v tretiranih skupinah, le da se ne tretirajo.
17. Odmerki snovi za pozitivno kontrolo morajo biti izbrani tako, da povzročajo blage ali zmerne učinke, ki kritično ocenijo uspešnost in občutljivost preskusa, vendar dosledno povzročajo pozitivne učinke dominantne smrtnosti. Primeri snovi za pozitivno kontrolo in ustrezni odmerki so navedeni v preglednici 1.

*Preglednica 1***Primeri snovi za pozitivno kontrolo**

SNOV [št. CAS] (referenčna št.)	Razpon efektivne doze (mg/kg) (vrsta glodavcev)	Čas dajanja (v dnevih)
Trietenmelamin [51-18-3] (15)	0,25 (miši)	1
Ciklofosamid [50-18-0] (19)	50–150 (miši)	5
Ciklofosamid [50-18-0] (5)	25–100 (podgane)	1
Etil metansulfonat [62-50-0] (13)	100-300 (miši)	5
Monomerni akrilamid [79-06-1] (17)	50 (miši)	5
Klorambucil [305-03-3] (14)	25 (miši)	1

Negativne kontrole

18. Živali za negativno kontrolo, tretirane samo s topilom ali vehiklom, sicer pa tretirane enako kot tretirane skupine, je treba vključiti za vsak čas vzorčenja (20). Če ni kontrolnih podatkov iz preteklih preskusov ali objavljenih podatkov, iz katerih bi bilo razvidno, da izbrano topilo/vehikel ne povzroča dominantnih smrtnosti ali drugih škodljivih učinkov, je treba za vsak čas vzorčenja vključiti tudi netretirane kontrolne živali, da se dokaže sprejemljivost kontrol z vehiklom.

POSTOPEK

Število živali

19. Posamezni samci se parijo v ustreznih vnaprej določenih intervalih (npr. tedenskih, odstavka 21 in 23), po možnosti z eno samico, ki se še ni parila. Število samcev na skupino je treba določiti vnaprej, da zadostuje (v povezavi s številom sparjenih samic pri vsakem intervalu parjenja) za zagotovitev statistične moči, potrebne za zaznavo vsaj podvojitve pogostnosti dominantne smrtnosti (odstavek 44).
20. Tudi število samic na interval parjenja je treba določiti vnaprej z izračuni statistične moči, da se omogoči zaznava vsaj podvojitve pogostnosti dominantne smrtnosti (tj. dovolj brejih samic, da se zagotovi vsaj 400 vseh ugnezditev) (20) (21) (22) (23) in da se pričakuje vsaj ena mrtva ugnezditev na enoto analize (tj. paritvena skupina na odmere) (24).

Obdobje dajanja odmerkov in intervali parjenja

21. Število intervalov parjenja po tretiranju je določeno s časovnim razporedom tretiranja in mora zagotavljati, da se v vseh fazah zorenja moške zarodne celice oceni indukcija dominantne smrtnosti (12) (25). Pri enkratnem tretiranju z dajanjem največ petih dnevni odmerkov je treba po zadnjem tretiranju v tedenskih intervalih izvesti osem (pri miših) ali deset (pri podganah) parjenj. Pri dajanju večkratnih odmerkov se lahko število intervalov parjenja zmanjša sorazmerno s podaljšanjem obdobja dajanja, pri čemer je treba ohraniti cilj, da se ocenijo vse faze spermatogeneze (npr. po 28-dnevni izpostavljenosti zadostujejo samo štiri tedenska parjenja, da se ocenijo vse faze spermatogeneze pri miših). Vsi časovni razporedi tretiranja in parjenja morajo biti znanstveno utemeljeni.
22. Samice morajo ostati pri samcih vsaj v času enega pojavnega ciklusa (npr. en teden zajema en pojavni cikel pri miših in podganah). Samice, ki se med enotedenskim intervalom niso parile, se lahko uporabijo za naslednji interval parjenja. Ali dokler se ne zgodi parjenje, kar se ugotovi ob prisotnosti semenčic v vagini ali ob prisotnosti vaginalnega zamaška.
23. Uporabljeni režim izpostavljenosti in parjenja je odvisen od glavnega namena študije dominantne smrtnosti. Če je cilj ugotoviti, ali zadevna kemikalija povzroča dominantne smrtnostne mutacije same po sebi, bi bila sprejemljiva metoda z izpostavitvijo celotnega kroga spermatogeneze (npr. sedem tednov pri miših, 5–7 tretiranj na teden) in parjenjem enkrat ob koncu zadevnega kroga. Če pa je cilj opredeliti vrsto zarodnih celic, občutljivo za indukcijo dominantne smrtnosti, potem je priporočljiva enkratna ali petdnevna izpostavljenost, ki ji sledi tedensko parjenje.

Velikost odmerkov

24. Če se izvede predhodna študija za določanje območja, ker ustrezni podatki, ki bi bili v pomoč pri izbiri odmerkov, niso na voljo, jo je treba izvesti v istem laboratoriju ter pri tem uporabiti iste vrste, sev, spol in režim tretiranja kot v glavni študiji (26). S študijo je treba določiti največji tolerančni odmerek (MTD), ki je opredeljen kot največji odmerek, ki ga je mogoče prenesti, ne da bi se pri tem pokazala toksičnost, ki bi v povezavi z obdobjem trajanja študije slednjo omejevala (na primer nenormalno vedenje ali odzivi, manjša upočasnitev pridobivanja telesne teže ali citotoksičnost za hematopoetski sistem), ne pa smrt ali znaki bolečine ali trpljenja, zaradi katerih je potrebna humana evtanazija (27).

25. Največji tolerančni odmerek tudi ne sme negativno vplivati na uspešnost parjenja (21).
26. Preskusne kemikalije s specifičnim biološkim delovanjem pri majhnih, netoksičnih odmerkih (kakor so hormoni in mitogeni) in kemikalije, ki kažejo nasičenost toksokinetičnih lastnosti, so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerkov in jih je treba oceniti za vsak primer posebej.
27. Da se pridobijo informacije o odzivu na odmerek, je treba v popolno študijo vključiti skupino negativne kontrole in vsaj tri velikosti odmerkov, ki so običajno ločeni s faktorjem 2, vendar ne več kot 4. Če preskusna kemikalija v študiji za določanje območja ali na podlagi obstoječih podatkov ne povzroča toksičnosti, mora biti najvišji odmerek pri enkratnem dajanju enak 2 000 mg/kg telesne teže. Če pa preskusna kemikalija povzroča toksičnost, mora biti največji tolerančni odmerek najvišji dani odmerek, v uporabljene velikosti odmerkov pa je treba po možnosti zajeti razpon od največjega odmerka do odmerka, ki povzroča malo ali nič toksičnosti. Pri kemikalijah, ki niso toksične, je mejni odmerek za obdobje dajanja, ki traja vsaj 14 dni, 1 000 mg/kg telesne teže na dan, za obdobja dajanja, krajša od 14 dni, pa je mejni odmerek 2 000 mg/kg telesne teže na dan.

Dajanje odmerkov

28. Pri načrtovanju preskusa je treba upoštevati predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh. Zato se lahko ob ustrezni utemeljitvi izberejo načini izpostavljenosti, kot so s prehrano, pitno vodo, podkožno, intravenozno, topično, z vdihavanjem, oralno (z gavažo) ali z vsadkom. V vsakem primeru je treba način izpostavljenosti izbrati tako, da se zagotovi ustrezna izpostavljenost ciljnih tkiv. Dajanje z intraperitonealno injekcijo običajno ni priporočljivo, saj to ni predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh, in se lahko uporabi samo na podlagi posebne znanstvene utemeljitve. Če je preskusna kemikalija primešana hrani ali pitni vodi, zlasti v primeru enega samega odmerka, je treba paziti, da med zaužitjem hrane in vode ter parjenjem preteče dovolj časa, da se lahko odkrijejo učinki (odstavek 31). Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat z gavažo ali injekcijo, je odvisna od velikosti preskusne živali. Količina običajno ne sme presegati 1 ml na 100 g telesne teže, razen pri vodnih raztopinah, pri katerih se lahko uporabi največ 2 ml na 100 g telesne teže. Uporabo večjih količin (če to dovoljuje zakonodaja o dobrobiti živali) je treba utemeljiti. Variabilnost preskusne količine je treba s prilagajanjem koncentracije obdržati na čim najnižji ravni, da se zagotovi konstantna količina glede na telesno težo pri vseh velikostih odmerka.

Opažanja

29. Vsaj enkrat na dan je treba opraviti splošna klinična opazovanja preskusnih živali in evidentirati klinične znake, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka. Vse živali je treba med obdobjem odmerjanja vsaj dvakrat na dan opazovati za odkrivanje obolevnosti in smrtnosti. Vse živali je treba stehtati ob začetku študije, vsaj enkrat na teden med študijami s ponavljajočimi se odmerki in ob evtanaziji. Porabo hrane je treba meriti vsaj tedensko. Če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba izmeriti porabo vode ob vsaki menjavi vode in vsaj tedensko. Živali, ki kažejo nesmrtonosne znake čezmerne toksičnosti, je treba evtanazirati pred koncem preskusnega obdobja (27).

Odvzem in obdelava tkiv

30. Samice se evtanazirajo v drugi polovici brejosti, in sicer miši na 13. dan brejosti (DB), podgane pa na 14.–15. dan brejosti. Maternice se pregledajo za dominantne smrtne učinke, da se določi število ugnездitev, živih in mrtvih zarodkov ter rumenih telesc.
31. Roga maternice in jajčnika se razkrijejo, da se preštejejo rumena telesca, zarodki pa se odstranijo, preštejejo in stehtajo. Paziti je treba, da se v maternicah preverijo resorpcije, ki jih zakrivajo živi zarodki, in da se zagotovi, da so preštete vse resorpcije. Evidentira se fetalna smrtnost. Evidentirata se tudi število uspešno oplojenih samic ter število vseh ugnездitev, izgub pred ugnездitvijo in smrtnost po ugnездitvi (vključene zgodnje in pozne resorpcije). Poleg tega se lahko vidni zarodki v Bouinovem fiksativu ohranijo še vsaj dva tedna po pregledu večjih zunanjih nepravilnosti (28), da se zagotovijo dodatne informacije o reproduktivnih in razvojnih učinkih preskusne snovi.

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

32. Podatke je treba povzeti v obliki preglednice, da se prikažejo število sparjenih samcev, število brejih samic in število nebrejih samic. Posebej je treba navesti rezultate vsakega parjenja, vključno z identiteto vsakega samca in samice. Za vsakega tretiranega samca je treba navesti interval parjenja in velikost odmerka, za vsako samico pa število živih in mrtvih ugnezditev.
33. Izguba po ugnezditvi se izračuna z določitvijo razmerja med mrtvimi ugnezditvami in skupnim številom ugnezditev iz tretirane skupine v primerjavi z razmerjem med mrtvimi ugnezditvami in skupnim številom ugnezditev iz kontrolne skupine z vehiklom/topilom.
34. Izguba pred ugnezditvijo se izračuna kot razlika med številom rumenih telesc in številom ugnezditev ali kot zmanjšanje povprečnega števila ugnezditev na samico v primerjavi s parjenji v kontrolah. Če je izguba pred ugnezditvijo ocenjena, je treba navesti tudi to.
35. Faktor dominantne smrtnosti se oceni kot: $(\text{pogini po ugnezditvi} / \text{skupno število ugnezditev na samico}) \times 100$.
36. Navesti je treba podatke o toksičnosti in kliničnih znakih (v skladu z odstavkom 29).

Merila za sprejemljivost

37. Sprejemljivost preskusa je določena z naslednjimi merili.
- Sočasna negativna kontrola je skladna z objavljenimi standardi za podatke o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov in podatki laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov, če so na voljo (glej odstavka 10 in 18).
 - Sočasne pozitivne kontrole povzročajo odzive, ki so skladni z objavljenimi standardi za podatke o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov ali podatkovno zbirko laboratorija o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, če je na voljo, in statistično značilno povečanje v primerjavi z negativno kontrolo (glej odstavka 17 in 18).
 - Analizirano je bilo ustrezno število vseh ugnezditev in odmerkov (odstavek 20).
 - Merila za izbor največjega odmerka so skladna z merili, opisanimi v odstavkih 24 in 27.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

38. Da bi dobili dovolj podatkov za analizo odziva na odmerke, je treba analizirati vsaj tri tretirane skupine, ki prejemajo odmerke.
39. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če:
- se vsaj pri enem od preskusnih odmerkov pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
 - je pri vsaj enem poskusnem pogoju (npr. tedenskem intervalu parjenja) povečanje povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim testom, in
 - če se pojavijo rezultati zunaj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali porazdelitve podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi), če so na voljo.

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da lahko povzroči dominantne smrtne mutacije v zarodnih celicah preskusnih živali. Priporočila glede najustrežnejših statističnih metod so opisana v odstavku 44; drugi priporočeni statistični pristopi so navedeni tudi v virih (20) (21) (22) (24) (29). V uporabljenih statističnih preskusih se mora kot poskusna enota preučiti žival.

40. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če:

- se pri nobenem od preskusnih odmerkov ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- pri nobenem poskusnem pogoju ni z odmerkom povezanega povečanja in
- če so vsi rezultati znotraj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi), če so na voljo.

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da ne more povzročiti dominantnih smrtnih mutacij v zarodnih celicah preskusnih živali.

41. Preverjanje jasno pozitivnega in jasno negativnega odziva ni potrebno.

42. Če odziv ni jasno negativen ali pozitiven in za pomoč pri opredelitvi biološke pomembnosti rezultatov (npr. šibko ali mejno povečanje) je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami z uporabo obstoječih podatkov o poskusih, kot je upoštevanje, ali je pozitiven rezultat zunaj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (30).

43. Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih, zato se zaključí, da je dvoumna.

44. V uporabljenih statističnih preskusih se mora kot poskusna enota preučiti samec. Čeprav je mogoče, da so podatki o številu (npr. število ugnездitev na samico) porazdeljeni po Poissonu in/ali da so deleži (npr. delež mrtvih ugnездitev) binomsko porazdeljeni, so taki podatki pogosto nadrazpršeni (31). Tako je treba pri statistični analizi najprej uporabiti preskus prevelike in premajhne razpršenosti z uporabo testov variance, kot je Cochranov test binomske variance (32) ali Taronejev $C(\alpha)$ -test za binomsko nadrazpršenost (31) (33). Če se ne zazna odstopanje od binomske razpršenosti, se lahko trendi deležev med velikostmi odmerkov preverijo z uporabo Cochran-Armitageevega trendnostnega testa (34), parne primerjave s kontrolno skupino pa se lahko preverijo z uporabo Fisherjevega eksaktnega testa (35). Če se ne zazna odstopanje od Poissonove razpršenosti, se lahko trendi pri šteju preverijo tudi z uporabo Poissonove regresije (36), parne primerjave s kontrolno skupino pa se lahko preverijo v okviru Poissonovega modela z uporabo parnih nasprotij (36). Če se zazna znatna nadrazpršenost ali podrazpršenost, se priporočajo neparametrične metode (23) (31). Mednje spadajo testi, ki temeljijo na rangih, kot so test po Jonckheere-Terpstraju za trend (37) in Mann-Whitneyjev testi (38) za parne primerjave s kontrolno skupino z vehiklom/topilom ter testi s permutacijami, ponovnim vzorčenjem ali samovzorčenjem za primerjave trendov in parne primerjave s kontrolno skupino (31) (39).

45. Pozitivni preskus dominantne smrtnosti zagotavlja dokaze o genotoksičnosti preskusne kemikalije v zarodnih celicah tretiranega samca preskusne vrste.

46. Upoštevanje tega, ali so dobljene vrednosti v razponu preteklih kontrol ali zunaj njega, lahko zagotovi smernice pri ocenjevanju biološke pomembnosti odziva (40).

Poročilo o preskusu

47. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Povzetek.

Preskusna kemikalija:

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;
- meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

Snov iz ene sestavine

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Priprava preskusne kemikalije:

- utemeljitev izbire vehikla;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu, če je znana;
- priprava pripravkov hrane in pitne vode ali pripravkov za vdihavanje;
- analitsko določanje sestave (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije), če je na voljo.

Preskusne živali:

- uporabljena vrsta/sev in utemeljitev izbire;
- število, starost in spol živali;

- izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;
- metoda edinstvene identifikacije živali;
- pri kratkotrajnih študijah: telesna teža posameznih samcev ob začetku in koncu preskusa; pri študijah, ki trajajo več kot en teden: teža posameznih živali med študijo in poraba hrane. Vključiti je treba razpon, srednjo vrednost in standardni odklon telesne teže za vsako skupino.

Preskusni pogoji:

- podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah (z vehiklom/topilom);
- podatki iz študije za določanje območja;
- utemeljitev izbire velikosti odmerkov;
- podrobnosti o pripravi preskusne kemikalije;
- podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;
- utemeljitev načina dajanja;
- metode za merjenje toksičnosti za živali, vključno s histopatološko ali hematološko analizo, če sta bili uporabljeni, ter pogostnost opazovanja živali in tehtanja;
- metode za preverjanje, ali je preskusna kemikalija dosegla ciljno tkivo ali krvni obtok, v primeru negativnih rezultatov;
- dejanski odmerek (v mg/kg telesne teže/dan), izračunan glede na koncentracijo preskusne kemikalije (v ppm) v hrani/pitni vodi in porabo hrane/pitne vode, če je ustrezno;
- podrobnosti o kakovosti hrane in vode;
- podrobnosti o obogatitvi okolja v kletki;
- podroben opis časovnega razporeda tretiranja in vzorčenj ter utemeljitev izbir;
- metoda za analgezijo;
- metoda za evtanazijo;
- postopki za izolacijo in hrambo tkiv;
- izvor in številka serij za vse complete in reagente (kjer je primerno);

- metode za štetje dominantnih smrtnosti;
- časovni razpored parjenja;
- uporabljene metode za določitev, ali je prišlo do parjenja;
- čas evtanazije;
- merila za štetje učinkov dominantne smrtnosti, vključno z rumenimi telesci, ugnezditevami, resorpcijami in izgubami pred ugnezditvijo, živimi ugnezditevami in mrtvimi ugnezditevami.

Rezultati:

- stanje živali pred preskusnim obdobjem in med njim, vključno z znaki toksičnosti;
- telesna teža samcev v obdobjih tretiranja in parjenja;
- število sparjenih samic;
- razmerje med odmerkom in odzivom, če je mogoče;
- podatki o sočasnih in preteklih negativnih kontrolah z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;
- podatki o sočasni pozitivni kontroli;
- tabelaričen prikaz podatkov za vsako samico, vključno s: številom rumenih telescev na samico; številom ugnezditev na samico; številom resorpcij in izgub pred ugnezditvijo na samico; številom živih ugnezditev na samico; številom mrtvih ugnezditev na samico; težo zarodkov;
- povzetek zgoraj navedenih podatkov za vsako obdobje parjenja in odmerka, s pogostnostmi dominantnih smrtnosti;
- uporabljene statistične analize in metode.

Razprava o rezultatih

Sklepna ugotovitev

VIRI

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.
- (2) Bateman, A. J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Kilbey, B. J., et. al. (ur.) str. 235–334, Elsevier, Amsterdam.

- (3) Ehling, U. H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., in Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group 'Dominant' lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, *Arch. Toxicol.*, 39, 173–185.
- (4) Shelby, M. D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. *Mutation Res.*, 352:159–167.
- (5) Knudsen, I., Hansen, E. V., Meyer, O. A., in Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. *Mutation Res.*, 48:267–270.
- (6) Anderson, D., Hughes, J. A., Edwards, A. J., in Brinkworth, M. H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. *Mutation Res.*, 397:77-74.
- (7) Shively, C. A., White, D. M., Blauch, J. L., in Tarka, S. M., Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol. Lett.* 20:325-329.
- (8) Rao, K. S., Cobel-Geard, S. R., Young, J. T., Hanley, T. R., Jr., Hayes, W. C., John, J. A., in Miller, R. R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 3:80–85.
- (9) Brewen, J. G., Payne, H. S., Jones, K. P., in Preston, R. J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, *Mutation Res.*, 33, 239–249.
- (10) Marchetti, F., Bishop, J. B., Cosentino, L., Moore, II, D., in Wyrobek, A. J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. *Biol. Reprod.*, 70:616–624.
- (11) Marchetti, F., in Wyrobek, A. J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. *Birth Defects Res.*, C 75:112–129.
- (12) Adler, I. D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. *Mutation Res.*, 352:169-172.
- (13) Favor, J., in Crenshaw, J. W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, *Mutation Res.*, 53: 21-27.
- (14) Generoso, W. M., Witt, K. L., Cain, K. T., Hughes, L., Cacheiro, N. L. A., Lockhart, A. M. C., in Shelby, M. D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. *Mutation Res.*, 345:167-180.
- (15) Hastings, S. E., Huffman, K. W., in Gallo, M. A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, *Mutation Res.*, 40:371–378.
- (16) James, D. A., in Smith, D. M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, *Mutation Res.*, 99:303–314.
- (17) Shelby, M. D., Cain, K. T., Hughes, L. A., Braden, P. W., in Generoso, W. M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. *Mutation Res.*, 173:35-40.

- (18) Sudman, P. D., Rutledge, J. C., Bishop, J. B., in Generoso, W. M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, *Mutation Res.*, 296: 143-156.
- (19) Holstrom, L. M., Palmer, A. K., in Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In *Supplementary Mutagenicity Tests*. Kirkland, D. J., in Fox, M. (ur.), Cambridge University Press, str. 129-156.
- (20) Adler, I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I., in Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, *Mutation Res.*, 417:19-30.
- (21) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T., in Tanaka, N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutation Res.*, 312:313-318.
- (22) Generoso, W. M., in Piegorsch, W. W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. *Methods, Toxicol.*, 3A:124-141.
- (23) Haseman, J. K., in Soares, E. R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. *Mutation. Res.*, 41: 277-288.
- (24) Whorton, E. B., Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 1:353-360.
- (25) Anderson, D., Hodge, M. C. E., Palmer, S., in Purchase, I. F. H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. *Mutation. Res.*, 85:417-429.
- (26) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J., in Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagen.*, 7:313-319.
- (27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 19), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (28) Barrow, M. V., Taylor, W. J., in Morphol, J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291-306.
- (29) Kirkland, D. J. (ur.).(1989). *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Cambridge University Press.
- (30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J., in Thybaud, V. (2011). 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', *Mutation. Res.*, 723:87-90.
- (31) Lockhart, A. C., Piegorsch, W. W., in Bishop, J. B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. *Mutation. Res.*, 272:35-58.
- (32) Cochran, W. G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. *Biometrics*, 10: 417-451.

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

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Kemikalija: snov ali zmes.

Rumeno telesce: struktura, ki izloča hormone, nastala na jajčniku na mestu folikla, iz katerega se je sprostilo jajčece. Število rumenih telesc v jajčnikih ustreza številu ovuliranih jajčec.

Dominantna smrtna mutacija: mutacija, ki nastane v zarodni celici ali se fiksira po oploditvi in povzroči smrt zarodka ali plodu.

Stopnja rodnosti: število sparjenih brijih samic glede na število sparjenih samic.

Interval parjenja: čas med koncem izpostavljenosti in parjenjem tretiranih samcev. Z uravnavanjem tega intervala se lahko ocenijo učinki kemikalij na različne vrste zarodnih celic. Pri miših, ki se parijo v 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. in 8. tednu po koncu izpostavljenosti, se merijo učinki na semenčice, kondenzirane spermatide, okrogle spermatide, pahitenske spermatocite, zgodnje spermatocite, diferencirane spermatogonije, diferenciacijske spermatogonije in spermatogonije iz matičnih celic.

Izguba pred ugnezditevjo: razlika med številom ugnezditev in številom rumenih telesc. Lahko se tudi oceni s primerjavo med skupnim številom ugnezditev na samico v tretirani in kontrolni skupini.

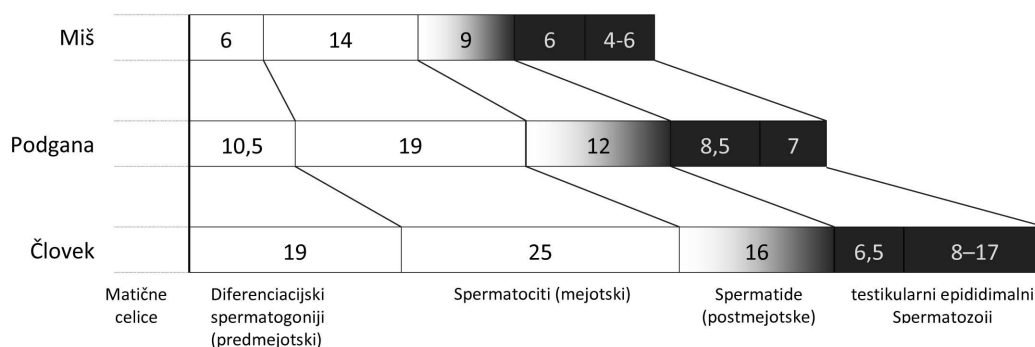
Izguba po ugnezditvi: razmerje med mrtvimi ugnezditvami v tretirani skupini v primerjavi z razmerjem med mrtvimi ugnezditvami in skupnim številom ugnezditev v kontrolni skupini.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti in biološki materiali.

Dodatek 2

ČAS SPERMATOGENEZE PRI SESALCIH



Slika 1: Primerjava med trajanjem (v dnevih) razvoja moške zarodne celice pri miših, podganah in ljudeh. Popravljanje DNK se ne pojavi v osenčenih obdobjih.

Shematski prikaz spermatogeneze pri miših, podganah in ljudeh je naveden zgoraj (povzeto po Adlerju, 1996). Med nediferencirane spermatogonije spadajo: A-enojni; A-parni; in A-poravnani spermatogoniji (Hess in de Franca, 2008). A-enojni se štejejo za dejanske matične celice; zato mora za oceno učinkov na matične celice preteči vsaj 49 dni (pri miši) med zadnjim injiciranjem preskusne kemikalije in parjenjem.

Viri

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

Hess, R. A., in De Franca, L. R. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. V: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, C. Yan Cheng (ur.), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.“

(4) Poglavlje B.23 dela B se nadomesti z naslednjim:

„B.23 PRESKUS KROMOSOMSKIH ABERACIJ V SPERMATOGONIJIH SESALCEV

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 483 (2016). Preskusne metode se redno preverjajo ob upoštevanju znanstvenega napredka, spreminjajočih se regulativnih zahtev in preudarkov v zvezi z dobrobitjo živali. Pri tej spremenjeni različici preskusne metode se upoštevajo večletne izkušnje s tem preskusom ter možnosti za združevanje ali kombiniranje tega preskusa z drugimi študijami toksičnosti ali genotoksičnosti. S kombiniranjem študij toksičnosti bi se lahko zmanjšalo število živali, uporabljenih pri preskušanju toksičnosti. Ta preskusna metoda je del sklopa preskusnih metod v zvezi z genetsko toksikologijo. OECD je pripravila dokument z jedrnatimi informacijami o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregledom nedavnih sprememb smernic OECD za preskušanje v zvezi z genetsko toksikologijo (1).
2. Namen *in vivo* preskusa kromosomskih aberacij v spermatogonijih sesalcev je opredeliti kemikalije, ki povzročijo strukturne kromosomske aberacije v spermatogonijskih celicah sesalcev (2) (3) (4). Poleg tega je ta preskus primeren za ocenjevanje genotoksičnosti, saj so pri tem aktivni dejavniki metabolizma *in vivo*, farmakokinetike in procesi popravljanja DNK, ki prispevajo k odzivu, čeprav se lahko med posameznimi vrstami razlikujejo. Ta preskusna metoda ni zasnovana za merjenje numeričnih anomalij; preskus se običajno ne uporablja za ta namen.
3. S tem preskusom se merijo strukturne kromosomske aberacije (kromosomskega in kromatidnega tipa) pri delitvi spermatogonskih zarodnih celic, zato se pričakuje, da se s preskusom napove povzročitev dednih mutacij v teh zarodnih celicah.
4. Opredelitve ključnih pojmov so navedene v Dodatku.

ZAČETNI PREUDARKI

5. V tem preskusu se običajno uporabljajo glodavci, vendar so lahko v nekaterih primerih primerne tudi druge vrste, če je to znanstveno upravičeno. Standardni citogenetski pripravki mod glodavcev povzročajo mitotično (spermatogoniji) in mejotično (spermatociti) metafazo. Mitotična in mejotična metafaza se opredelita na podlagi morfologije kromosomov (4). S tem citogenetskim preskusom *in vivo* se zaznajo strukturne kromosomske aberacije pri mitotični spermatogoniji. Druge tarčne celice niso predmet te preskusne metode.
6. Da se zaznajo aberacije kromatidnega tipa v spermatogonijih, je treba pregledati prvo mitotsko delitev celic po tretiranju, preden se te aberacije v naslednjih celičnih delitvah pretvorijo v aberacije kromosomskega tipa. Dodatne informacije o tretiranih spermatocitih se lahko pridobijo z analizo kromosomskih strukturnih aberacij pri mejotskih kromosomih v diakinezi-metafazi I in metafazi II.
7. V modu so številne generacije spermatogonijev (5), te različne vrste zarodnih celic pa so lahko različno občutljive za tretiranje s kemikalijami. Zaznane aberacije tako pomenijo skupni odziv tretiranih populacij spermatogonijev. Večina mitotičnih celic v pripravkih mod so spermatogoniji B, katerih celični cikel traja približno 26 ur (3).
8. Če obstajajo dokazi, da preskusna kemikalija ali njeni metaboliti ne bodo dosegli moda, ta preskus ni primeren.

NAČELO PRESKUSNE METODE

9. Običajno se živali preskusni kemikaliji izpostavijo z ustreznim načinom izpostavljenosti, ob primernem času po tretiranju pa se evtanazirajo. Pred evtanazijo se živali tretirajo z zaviralcem metafaze (npr. kolhicinom ali Colcemidom®). Nato se pripravijo in obarvajo preparati kromosomov iz zarodnih celic ter analizirajo kromosomske aberacije v celicah v metafazi.

PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI LABORATORIJA

10. Usposobljenost za ta preskus je treba dokazati tako, da se pokaže sposobnost za ponovitev pričakovanih rezultatov v zvezi s pogostnostjo strukturnih kromosomskih aberacij v spermatogonijih s snovmi za pozitivno kontrolo (vključno z blagimi odzivi), kot so tiste iz preglednice 1, ter dobijo pogostnosti iz negativnih kontrol, ki so v skladu s sprejemljivim razponom podatkov o kontrolah v objavljenih virih (npr. (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)) ali s porazdelitvijo kontrol iz preteklih preskusov laboratorija, če je na voljo.

OPIS METODE

Pripravki*Izbira živalskih vrst*

11. Uporabiti je treba splošno uporabljane laboratorijske seve zdravih mladih odraslih živali. Običajno se uporabljajo samci miši; lahko pa se uporabijo tudi samci drugih ustreznih vrst sesalcev, kadar je to znanstveno utemeljeno in da se lahko ta preskus izvede v povezavi z drugo preskusno metodo. Uporabo drugih vrst, ki niso glodavci, je treba znanstveno utemeljiti v poročilu.

Pogoji nastanitve in hranjenja živali

12. Pri glodavcih mora biti temperatura v prostoru z živalmi $22\text{ °C} (\pm 3\text{ °C})$. Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 40-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna, pri čemer je zaporedje 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne mešanice preskusne kemikalije, kadar se daje na ta način. Glodavce je treba nastaniti v majhnih skupinah (ne več kot pet na kletko), če ni pričakovati agresivnega vedenja, in sicer po možnosti v kletke s trdimi tlemi z ustrezno okoljsko obogatitvijo. Živali so lahko nastanjene posamično le, če je to znanstveno utemeljeno.

Priprava živali

13. Običajno se uporabljajo zdravi mladi samci (ob začetku tretiranja stari od 8 do 12 tednov), ki se naključno razporedijo v kontrolno in tretirano skupino. Posamezne živali se označijo z edinstvenimi oznakami s humano, čim manj invazivno metodo (npr. z namestitvijo obročkov ali trakov, z vsaditvijo mikročipa ali biometrično identifikacijo, ne pa z zarezovanjem ušesa ali prsta) ter se vsaj pet dni prilagajajo laboratorijskim pogojem. Kletke je treba razporediti tako, da se čim bolj zmanjšajo morebitni učinki, ki nastanejo zaradi razporeditve kletk. Izogibati se je treba navzkrižni kontaminaciji med pozitivno kontrolo in preskusno kemikalijo. Ob začetku študije mora biti razlika med težami posameznih živali čim manjša in ne sme presegati $\pm 20\%$.

Priprava odmerkov

14. Trdne preskusne kemikalije je treba raztopiti ali suspendirati v ustreznih topilih ali vehiklih ali primešati hrani ali pitni vodi, preden se odmerijo živalim. Tekoče preskusne kemikalije se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Pri izpostavljenosti z vdihavanjem se lahko preskusne kemikalije glede na svoje fizikalno-kemijske lastnosti dajejo v obliki plina, pare ali trdnega/tekočega aerosola. Uporabiti je treba sveže pripravljene preskusne kemikalije, razen če je iz podatkov o stabilnosti razvidno, da je shranjevanje sprejemljivo, in so v njih opredeljeni ustrezni pogoji shranjevanja.

Pogoji preskusa – topilo/vehikel

15. Topilo/vehikel ne sme imeti toksičnih učinkov pri uporabljenih odmerkih in ne sme biti sposoben kemično reagirati s preskusnimi kemikalijami. Če se uporabijo druga, manj znana topila/vehikli, je treba njihovo uporabo podpreti z referenčnimi podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila/vehikla. Primeri pogosto uporabljenih, združljivih topil/vehiklov so voda, fiziološka raztopina, raztopina metilceluloze, raztopina natrijeve soli karboksimetil celuloze, oljčno olje in koruzno olje. Če ni podatkov iz preteklih preskusov ali objavljenih podatkov, iz katerih bi bilo razvidno, da izbrano neobičajno topilo/vehikel ne povzroča strukturnih kromosomskih aberacij ali drugih škodljivih učinkov, je treba izvesti začetno študijo, da se dokaže sprejemljivost kontrol s topilom/vehiklom.

Pozitivne kontrole

16. Vedno je treba uporabiti živali za sočasne pozitivne kontrole, razen če je laboratorij dokazal usposobljenost za izvedbo preskusa in je v zadnjem času preskus redno uporabljal (npr. v zadnjih petih letih). Če sočasna pozitivna kontrolna skupina ni vključena, je treba v vsak poskus vključiti kontrole za štetje (fiksirani in nebarvani mikroskopski preparati). Ti se lahko pridobijo tako, da se pri študiji v štetje vključijo ustrezni referenčni vzorci, pridobljeni in shranjeni v okviru ločenega poskusa s pozitivnimi kontrolami, ki se v laboratoriju, kjer se preskus izvaja, redno izvaja (npr. vsakih 6 do 18 mesecev); na primer med preverjanjem usposobljenosti in po tem redno, če je to potrebno.
17. Snovi za pozitivno kontrolo morajo zanesljivo povzročiti zaznavno povečanje pogostnosti celic s spontanimi strukturnimi kromosomskimi aberacijami. Odmerke za pozitivno kontrolo je treba izbrati tako, da so učinki jasni, vendar osebi, ki ugotovitve evidentira, ne razkrijejo takoj identitete označenih mikroskopskih preparatov. Primeri snovi za pozitivno kontrolo so navedeni v preglednici 1.

*Preglednica 1***Primeri snovi za pozitivno kontrolo**

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

Negativne kontrole

18. Živali za negativne kontrole, tretirane samo s topilom ali vehiklom, sicer pa obravnavane enako kot tretirane skupine, je treba vključiti za vsak čas vzorčenja. Če ni podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov ali objavljenih podatkov, iz katerih bi bilo razvidno, da izbrano topilo/vehikel ne povzroča kromosomskih aberacij ali drugih škodljivih učinkov, je treba za vsak čas vzorčenja vključiti tudi netretirane kontrolne živali, da se dokaže sprejemljivost kontrol z vehiklom.

POSTOPEK

Število živali

19. Velikosti skupine ob začetku študije je treba določiti z namenom, da se zagotovi vsaj pet samcev na skupino. To število živali na skupino se šteje za zadostno, da se zagotovi ustrezna statistična moč (tj. običajno sposobna zaznati vsaj podvojitev pogostnosti kromosomskih aberacij, ko je stopnja negativne kontrole 1,0-odstotna ali več z 80-odstotno verjetnostjo pri stopnji značilnosti 0,05) (3) (11). Praviloma je za študijo pri dveh časih vzorčenja s tremi skupinami, ki prejemajo odmerke, ter sočasno negativno in pozitivno kontrolno skupino (pri čemer je vsaka skupina sestavljena iz vsaj petih živali) običajno potrebnih 45 živali.

Časovni razpored tretiranja

20. Preskusne kemikalije se običajno dajo enkrat (tj. kot eno tretiranje); lahko se uporabijo tudi drugi režimi odmerjanja, če so znanstveno utemeljeni.
21. Pri skupini z največjim odmerkom se vzorci vzamejo dvakrat po tretiranju. Čas, potreben za sprejem in metabolizem preskusnih kemikalij ter njihov učinek na dinamiko celičnega cikla, lahko vpliva na optimalni čas za zaznavo kromosomskih aberacij, zato je eno vzorčenje zgodnje in drugo pozno, izvedeno približno 24 oziroma 48 ur po tretiranju. Pri vseh drugih odmerkih je treba zgodnje vzorčenje opraviti 24 ur (tj. času, krajšem od trajanja ali enakem trajanju celičnega cikla spermatogonijev B, s čimer se izboljša verjetnost štetja prvih metafaz po tretiranju) po tretiranju, razen če je znano, da so primernejši in utemeljeni drugi časi vzorčenja.
22. Uporabijo se lahko tudi drugi časi vzorčenja. Na primer pri kemikalijah, ki povzročijo učinke, neodvisne od faze S, bi bilo lahko primerno vzorčiti bolj zgodaj (tj. prej kot v 24 urah).
23. Uporabi se lahko režim tretiranja s ponovljenimi odmerki, na primer v povezavi s preskusom na drugi končni točki, ki uporablja 28-dnevno obdobje dajanja (npr. preskusna metoda B.58); vendar bi bile za izvedbo različnih časov vzorčenja potrebne dodatne skupine živali. Tako je treba ustreznost takega časovnega razporeda znanstveno utemeljiti za vsak primer posebej.
24. Živalim se pred evtanazijo intraperitonealno vbrizga ustrezen odmerek zaviralca metafaze (npr. Colcemid® ali kolhicin). Zatem se živali vzorčijo v ustreznem časovnem intervalu. Pri miših in podganah je ta interval približno 3–5 ur.

Velikost odmerkov

25. Če se izvede predhodna študija za določanje območja, ker ustrezni podatki, ki bi bili v pomoč pri izbiri odmerkov, niso na voljo, jo je treba izvesti v istem laboratoriju, pri tem uporabiti iste vrste, sev in režim tretiranja kot v glavni študiji ter upoštevati priporočila za izvedbo študij za določanje območja (12). S to študijo je treba določiti največji tolerančni odmerek (MTD), ki je opredeljen kot odmerek, ki povzroči blage toksične učinke, povezane s trajanjem študije (na primer nenormalno vedenje ali odzivi, manjša upočasnitev pridobivanja telesne teže ali citotoksičnost za hematopoetski sistem), ne pa smrti ali znakov bolečine, trpljenja ali stiske, zaradi katerih je treba živali evtanazirati (13).
26. Največji odmerek se lahko opredeli tudi kot odmerek, ki povzroči nekaj znakov toksičnosti v spermatogonijih (npr. zmanjšanje razmerja med mitozami spermatogonijev v prvi in drugi mejotski metafazi). To zmanjšanje naj ne bi presegalo 50 %.

27. Preskusne kemikalije s specifičnim biološkim delovanjem pri majhnih, netoksičnih odmerkih (kakor so hormoni in mitogeni) in kemikalije, ki kažejo nasičenost toksokinetičnih lastnosti, so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerkov in jih je treba oceniti za vsak primer posebej.
28. Da se pridobijo informacije o odzivu na odmerek, je treba v popolno študijo vključiti skupino negativne kontrole (odstavek 18) in vsaj tri velikosti odmerkov, ki so običajno ločeni s faktorjem 2, vendar ne več kot 4. Če preskusna kemikalija v študiji za določanje območja ali na podlagi obstoječih podatkov ne povzroča toksičnosti, mora biti najvišji odmerek pri enkratnem dajanju enak 2 000 mg/kg telesne teže. Če pa preskusna kemikalija povzroča toksičnost, mora biti največji tolerančni odmerek najvišji dani odmerek, v uporabljenih velikostih odmerkov pa je treba po možnosti zajeti razpon od največjega odmerka do odmerka, ki povzroča malo ali nič toksičnosti. Kadar se toksičnost za ciljno tkivo (tj. modo) opazi pri vseh preskušanih velikostih odmerkov, je priporočljiva dodatna študija pri netoksičnih odmerkih. Pri študijah, namenjenih celovitejši opredelitvi kvantitativnih informacij o razmerju med odmerkom in odzivom, so morda potrebne dodatne skupine, ki prejemajo odmerke. Za določene vrste preskusnih kemikalij (npr. zdravila za uporabo v humani medicini), za katere veljajo posebne zahteve, se lahko te meje razlikujejo. Če preskusna kemikalija povzroča toksičnost, je treba izbrati mejni odmerek in dva nižja odmerka (kot je opisano zgoraj). Mejni odmerek pri obdobju dajanja, ki traja vsaj 14 dni, je 1 000 mg/kg telesne teže na dan, pri obdobjih dajanja, krajših od 14 dni, pa je mejni odmerek 2 000 mg/kg telesne teže na dan.

Dajanje odmerkov

29. Pri načrtovanju preskusa je treba upoštevati predvideni način izpostavljenosti pri ljudeh. Zato se lahko ob ustreznih utemeljitvi izberejo načini izpostavljenosti, kot so s prehrano, pitno vodo, lokalno podkožno, intravenozno, oralno (z gavažo), z vdihavanjem ali vsadkom. Vsekakor pa je treba način izbrati tako, da zagotovi ustrezno izpostavljenost ciljnih tkiv. Dajanje z intraperitonealno injekcijo običajno ni priporočljivo, razen če je znanstveno utemeljeno, saj navadno ni fiziološko ustrezen način izpostavljenosti pri ljudeh. Če je preskusna kemikalija primešana hrani ali pitni vodi, zlasti v primeru enega samega odmerka, je treba paziti, da med zaužitjem hrane in vode ter vzorčenjem preteče dovolj časa, da se lahko zaznajo učinki (glej odstavek 33). Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat z gavažo ali injekcijo, je odvisna od velikosti preskusne živali. Količina običajno ne sme presegati 1 ml/100 g telesne teže, razen pri vodnih raztopinah, pri katerih se lahko uporabi največ 2 ml/100 g telesne teže. Uporabo večjih količin (če to dovoljuje zakonodaja o dobrobiti živali) je treba utemeljiti. Variabilnost preskusne količine je treba s prilagajanjem koncentracije obdržati na čim najnižji ravni, da se zagotovi konstantna količina glede na telesno težo pri vseh velikostih odmerka.

Opažanja

30. Vsaj enkrat na dan je treba opraviti splošna klinična opazovanja preskusnih živali in evidentirati klinične znake, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka. Vse živali je treba vsaj dvakrat na dan opazovati za odkrivanje obolenosti in smrtnosti. Vse živali je treba stehati ob začetku študije, vsaj enkrat na teden med študijami s ponavljajočimi se odmerki in ob evtanaziji. V študijah, ki trajajo en teden ali več, je treba vsaj enkrat na teden izmeriti porabo hrane. Če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo, je treba izmeriti porabo vode ob vsaki menjavi vode in vsaj tedensko. Živali, ki kažejo nesmrtonosne znake čezmerne toksičnosti, je treba evtanazirati pred koncem preskusnega obdobja (13).

Priprava kromosomov

31. Takoj po evtanaziji se iz enega ali obeh mod pridobijo suspenzije zarodnih celic, ki se nato izpostavijo hipotonični raztopini in fiksirajo po ustaljenih protokolih (npr. (2) (14) (15)). Celice se nato nanesejo na objektna stekelca in obarvajo (16) (17). Vsa stekelca morajo biti označena tako, da oseba, ki evidentira ugotovitve, ne pozna njihovih identitet.

Analiza

32. Za vsako žival je treba v štetje vključiti vsaj 200 dobro vidnih metafaz (3) (11). Če je pogostnost preteklih negativnih kontrol $< 1\%$, je treba v štetje vključiti več kot 200 celic/žival, da se poveča statistična moč (3). Uporabiti je treba metode obarvanja, ki omogočajo opredelitev centromere.

33. Aberacije kromosomskega in kromatidnega tipa je treba evidentirati posebej in razvrstiti glede na podvrste (prelomi, izmenjave). Vrzeli je treba evidentirati, vendar jih ni treba upoštevati pri ugotavljanju, ali kemikalija povzroča znatno povečanje pojava celic s kromosomskimi aberacijami. S postopki, ki se uporabljajo v laboratoriju, je treba zagotoviti, da analizo kromosomskih aberacij izvajajo osebe, ki so dobro usposobljene za štetje. Ob priznavanju, da postopki pripravljanja preparatov pogosto povzročijo pretrganje dela metafaz in posledično izgubo kromosomov, število centromer v štetih celicah torej ne sme biti manjše od $2n \pm 2$, pri čemer je n haploidno število kromosomov za zadevno vrsto.
34. Čeprav je preskus namenjen zaznavanju strukturnih kromosomskih aberacij, je pomembno, da se pogostnosti poliploidnih celic in celic z endoredupliciranimi kromosomi evidentirata, ko se opazita (glej odstavek 44).

PODATKI IN POROČANJE

Obdelava rezultatov

35. Podatke za posamezne živali je treba prikazati v obliki preglednic. Za vsako žival je treba oceniti število celic s strukturnimi kromosomskimi aberacijami in število kromosomskih aberacij na celico. Ločeno je treba navesti aberacije kromatidnega in kromosomskega tipa, razvrščene glede na podvrste (prelomi, izmenjave), skupaj z njihovim številom in pogostnostmi za poskusne in kontrolne skupine. Vrzeli se evidentirajo ločeno. O pogostnosti vrzeli se poroča, vendar se običajno ne vključi v analizo celotne pogostnosti strukturnih kromosomskih aberacij. Ko se opazijo poliploidija in/ali celice z endoredupliciranimi kromosomi, se poroča o njihovem deležu.
36. Navesti je treba podatke o toksičnosti in kliničnih znakih (v skladu z odstavkom 30).

Merila za sprejemljivost

37. Sprejemljivost preskusa je določena z naslednjimi merili.
- Sočasna negativna kontrola je skladna z objavljenimi standardi za podatke o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, ki naj bi na splošno znašali $> 0\%$ in $\leq 1,5\%$ celic s kromosomskimi aberacijami, ter podatki laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov, če so na voljo (glej odstavek 10 in 18).
 - Sočasne pozitivne kontrole povzročajo odzive, ki so skladni z objavljenimi standardi za podatke o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov ali zbirko podatkov laboratorija o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, če je na voljo, in statistično značilno povečanje v primerjavi z negativno kontrolo (glej odstavek 17 in 18).
 - Analizirano je bilo ustrezno število celic in odmerkov (glej odstavek 28 in 32).
 - Merila za izbor največjega odmerka so skladna z merili, opisanimi v odstavkih 25 in 26.
38. Če se opazita mitotična in mejoza, je treba določiti razmerje med mitozami spermatogonijev v prvi in drugi mejotski metafazi kot merilo citotoksičnosti za vse tretirane živali in živali negativne kontrole v celem vzorcu 100 deležih se celic na žival. Če se opazi le mitotična, je treba določiti mitotični indeks v vsaj 1 000 celicah za vsako žival.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

39. Da bi dobili dovolj podatkov za analizo odziva na odmere, je treba analizirati vsaj tri tretirane skupine, ki prejemajo odmerke.

40. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če:

- se vsaj pri enem od preskusnih odmerkov pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- je povečanje povezano z odmerkom pri vsaj enem času vzorčenja in
- je kateri koli od rezultatov zunaj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali porazdelitve podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi), če je na voljo.

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da lahko povzroča kromosomske aberacije v spermatogonijah preskusnih živali. Priporočila glede najustrežnejših statističnih metod so navedena tudi v virih (11) (18). V uporabljenih statističnih preskusih se mora kot poskusna enota preučiti žival.

41. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če:

- se pri nobenem od preskusnih odmerkov ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- pri nobenem poskusnem pogoju ni z odmerkom povezanega povečanja in
- če so vsi rezultati znotraj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi), če so na voljo.

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da ne more povzročiti nastanka kromosomskih aberacij v spermatogonijah preskusnih živali. Priporočila glede najustrežnejših statističnih metod so navedena tudi v virih (11) (18). Negativen rezultat ne izključuje možnosti, da lahko kemikalija povzroči kromosomske aberacije v poznejših razvojnih fazah, ki niso preučene, ali genske mutacije.

42. Preverjanje jasno pozitivnega in jasno negativnega odziva ni potrebno.

43. Če odziv ni jasno negativen ali pozitiven in za pomoč pri opredelitvi biološke pomembnosti rezultatov (npr. šibko ali mejno povečanje) je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami z uporabo obstoječih podatkov o poskusih, kot je upoštevanje, ali je pozitiven rezultat zunaj sprejemljivega razpona podatkov o negativnih kontrolah ali podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (19).

44. Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih, zato se zaključí, da je dvomna.

45. Povečanje števila poliploidnih celic lahko kaže na to, da ima preskusna kemikalija potencial za zaviranje mitotičnih procesov in povzročanje numeričnih kromosomskih aberacij (20). Povečanje števila celic z endoredupliciranimi kromosomi lahko pomeni, da ima preskusna kemikalija potencial za zaviranje poteka celičnega cikla (21) (22), kar je drugačen mehanizem povzročanja numeričnih kromosomskih sprememb kot zaviranje mitotičnih procesov (glej odstavek 2). Pojav poliploidnih celic in celic z endoredupliciranimi kromosomi je zato treba evidentirati ločeno.

Poročilo o preskusu

46. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

*Povzetek.**Preskusna kemikalija:*

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;
- meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

Snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Priprava preskusne kemikalije:

- utemeljitev izbire vehikla;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu;
- priprava pripravkov hrane in pitne vode ali pripravkov za vdihavanje;
- analitsko določanje sestave (npr. stabilnost, homogenost, nominalne koncentracije), kadar se izvaja.

Preskusne živali:

- uporabljena vrsta/sev in utemeljitev izbire;
- število in starost živali;
- izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;

- metoda edinstvene identifikacije živali;
- pri kratkotrajnih študijah: teža posameznih živali ob začetku in koncu preskusa; pri študijah, ki trajajo več kot en teden: teža posameznih živali med študijo in poraba hrane. Vključiti je treba razpon, srednjo vrednost in standardni odklon telesne teže za vsako skupino.

Preskusni pogoji:

- podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah (z vehiklom/topilom);
- podatki iz študije za določanje območja, če je bila izvedena;
- utemeljitev izbire velikosti odmerkov;
- utemeljitev načina dajanja;
- podrobnosti o pripravi preskusne kemikalije;
- podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;
- razlogi za čas usmrtnitve;
- metode za merjenje toksičnosti za živali, vključno s histopatološko ali hematološko analizo, če sta bili uporabljeni, ter pogostnost opazovanja živali in tehtanja;
- metode za preverjanje, ali je preskusna kemikalija dosegla ciljno tkivo ali krvni obtok, v primeru negativnih rezultatov;
- dejanski odmerek (v mg/kg telesne teže/dan), izračunan glede na koncentracijo preskusne kemikalije (v ppm) v hrani/pitni vodi in porabo hrane/pitne vode, če je ustrezno;
- podrobnosti o kakovosti hrane in vode;
- podroben opis časovnega razporeda tretiranja in vzorčenj ter utemeljitev izbir;
- metoda za evtanazijo;
- metoda za analgezijo (če se uporablja);
- postopki za izolacijo tkiv;
- identiteta kemikalije, ki zavira metafazo, njena koncentracija in čas tretiranja;
- metode za pripravo preparatov;

- merila za štetje aberacij;
- število analiziranih celic na žival;
- merila za obravnavanje študij kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih.

Rezultati:

- stanje živali pred preskusnim obdobjem in med njim, vključno z znaki toksičnosti;
- telesna teža in teža organov ob usmrčitvi (če se uporabljajo večkratna tretiranja, telesne teže med režimom tretiranja);
- znaki toksičnosti;
- mitotični indeks;
- razmerje med mitozami spermatogonijev v prvi in drugi mejotski metafazi ali drugi dokazi o izpostavljenosti ciljnemu tkivu;
- vrsta in število aberacij, navedena za vsako žival posebej;
- skupno število aberacij na skupino s srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;
- število celic z aberacijami na skupino s srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni;
- razmerje med odmerkom in odzivom, če je mogoče;
- uporabljene statistične analize in metode;
- podatki o sočasni negativni kontroli;
- podatki o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov z območji, srednjimi vrednostmi, standardnimi odkloni in 95-odstotnim intervalom zaupanja (kadar je na voljo) ali objavljeni podatki o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, uporabljeni za sprejemljivost rezultatov preskusa;
- podatki o sočasni pozitivni kontroli;
- spremembe v ploidnosti, če so opažene, vključno s pogostnostjo poliploidije in/ali endoredupliciranih celic.

*Razprava o rezultatih**Sklepna ugotovitev***VIRI**

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.
- (2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. V: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. ur. Venitt, S., in Parry, J. M. IRL Press, Oxford, Washington DC, str. 275–306.
- (3) Adler, I.-D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T., in Tanaka, N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313–318.
- (4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167–189.
- (5) Hess, R. A., in de Franca, L. R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. V: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Cheng, C. Y. (ur.). Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, str. 1–15.
- (6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368–379. Adler, I.-D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. V: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B., in Magnusson, J. (ur.). Liss, New York, str. 477–484.
- (7) Cattanaach, B. M., in Pollard, C. E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472–474.
- (8) Cattanaach, B. M., in Williams, C. E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371–375.
- (9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135–140.
- (10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313–324.
- (11) Adler, I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I., in Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.
- (12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J., in Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313–319.

- (13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment (št. 19), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (14) Yamamoto, K., in Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutation Res.*, 52, 207–209.
- (15) Hsu, T. C., Elder, F., in Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. *Environ. Mutagen.*, 1, 291–294.
- (16) Evans, E. P., Breckon, G., in Ford, C. E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, 289–294.
- (17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G., in Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays. V: Kirkland, D. J. (ur.). Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 115–141.
- (18) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G., in Savage, J. R. K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. V: Kirkland, D. J. (ur.). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 184–232.
- (19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J., in Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutation Res.*, 723, 87–90.
- (20) Warr, T. J., Parry, E. M., in Parry, J. M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, *Mutation Res.*, 287, 29–46.
- (21) Huang, Y., Change, C., in Trosko, J. E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. *Cancer Res.*, 43, 1362–1364.
- (22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. *Mutation Res.*, 119, 403–413.

Dodatek

OPREDELITVE POJMOV

Aneuploidija: vsako odstopanje od normalnega diploidnega (ali haploidnega) števila kromosomov za en ali več kot en kromosom, vendar ne za celotni set kromosomov (poliploidija).

Centromera: del kromosoma, s katerim se med delitvijo celic povežejo niti delitvenega vretena, kar omogoči urejeno gibanje hčerinskih kromosomov proti poloma hčerinskih celic.

Kemikalija: snov ali zmes.

Raznolikost kromosomov: raznolikost oblik (npr. metacentrični, akrocentrični itd.) in velikosti kromosomov.

Aberacija kromatidnega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom posamezne kromatide ali prelom in združitev med kromatidama.

Aberacija kromosomskega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom ali prelom in združitev obeh kromatid na istem mestu.

Klastogen: vsaka kemikalija, ki povzroči strukturne kromosomske aberacije v populacijah celic ali organizmih.

Vrzel: akromatska lezija, ki je manjša od širine ene kromatide, z zelo majhno nepravilnostjo kromatid.

Genotoksično: splošni pojem, ki zajema vse vrste poškodb DNK ali kromosomov, vključno s prelomi, delecijami, adukti, nukleotidnimi spremembami in povezavami, prerazporeditvami, mutacijami, kromosomskimi aberacijami in aneuploidijo. Vsi genotoksični učinki ne vplivajo na nastanek mutacij ali trajnih poškodb kromosomov.

Mitotični indeks (MI): razmerje med številom celic v metafazi in skupnim številom celic v opazovani populaciji celic; kazalnik stopnje proliferacije te populacije.

Mitoza: delitev celičnega jedra, ki je običajno razdeljena na profazo, prometafazo, metafazo, anafazo in telofazo.

Mutageno: povzroča dedno spremembo zaporedij baznih parov DNK v genih ali strukture kromosomov (kromosomske aberacije).

Numerična anomalija: sprememba števila kromosomov, ki se razlikuje od normalnega števila, ki je značilno za uporabljene živali.

Poliploidija: večkratnik haploidnega števila kromosomov (n), razen diploidnega števila (tj. $3n$, $4n$ in tako naprej).

Strukturna aberacija: sprememba v strukturi kromosoma, ki se lahko zazna pri mikroskopskem pregledu metafaze celične delitve in je vidna v obliki delecij in fragmentov, izmenjav.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti in biološki materiali.“

(5) Poglavje B.40 dela B se nadomesti z naslednjim:

„B.40 JEDKOST ZA KOŽO IN VITRO: PRESKUSNA METODA TRANSKUTANE ELEKTRIČNE UPORNOSTI (TER)

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 430 (2015). Jedkost za kožo pomeni nastanek nepovračljive poškodbe kože, ki se kaže kot vidno odmiranje prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije (kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) ⁽¹⁾). Pri tej posodobljeni preskusni metodi B.40 se izvede postopek *in vitro*, ki omogoča opredelitev nejedkih in jedkih snovi ter zmesi v skladu z GHS ZN (1) in uredbo CLP.
2. Ocena jedkosti za kožo se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali (preskusna metoda B.4, enakovredna Smernici OECD za preskušanje 404, ki je bila prvotno sprejeta leta 1981 ter revidirana v letih 1992, 2002 in 2015) (2). Poleg sedanje preskusne metode B.40 so bile validirane še druge preskusne metode *in vitro* za preskušanje potenciala kemikalij za povzročanje jedkosti za kožo, ki so bile sprejete kot preskusna metoda B.40a (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 431) (3) in preskusna metoda B.65 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 435) (4), s katerima se lahko po potrebi opredelijo tudi podkategorije jedkih kemikalij. Več validiranih preskusnih metod *in vitro* je bilo sprejetih kot preskusna metoda B.46 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 439) (5), ki naj bi se uporabljala za preskušanje draženja kože. V Smernici OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi z jedkostjo za kožo in draženjem kože je opisanih več modulov, v katerih so zbrani različni viri informacij in orodja za analizo, zagotovljene smernice o tem, (i) kako obstoječe podatke, pridobljene s preskušanjem, in podatke, ki ne temeljijo na preskušanju, združiti in uporabiti pri ocenjevanju potenciala kemikalij za draženje kože in jedkost za kožo, (ii) predlagan pa je tudi pristop, kadar je potrebno dodatno preskušanje (6).
3. S to preskusno metodo se obravnava končna točka jedkost za kožo z vidika zdravja ljudi. Temelji na preskusni metodi transkutane električne upornosti (TER) pri podganah, pri kateri se z uporabo kožnih ploščic opredelijo jedke snovi glede na njihovo zmožnost zmanjšati celovitost in pregradno funkcijo rožene plasti pokožnice. Ustrezna smernica OECD za preskušanje je bila prvotno sprejeta leta 2004, leta 2015 pa je bila posodobljena zaradi sklicevanja na dokument s smernicami IATA.
4. Za oceno preskušanja *in vitro* v zvezi z jedkostjo za kožo za regulativne namene so bile izvedene predvalidacijske študije (7), ki jim je sledila uradna validacijska študija preskusne metode TER na podganji koži za oceno jedkosti za kožo (8) (9) (10) (11). Na podlagi izidov teh študij je bilo izdelano priporočilo, da se lahko preskusna metoda TER (imenovana validirana referenčna metoda – VRM) uporabi za regulativne namene za oceno jedkosti za kožo *in vivo* (12) (13) (14).
5. Preden se omogoči uporaba predlagane podobne ali spremenjene preskusne metode TER *in vitro* v zvezi z jedkostjo za kožo, ki ni VRM, za regulativne namene, je treba določiti njeno zanesljivost, ustreznost (točnost) in omejitve, kar zadeva predlagano uporabo, da se zagotovi njena podobnost z VRM v skladu s standardi izvajanja (15). Medsebojno priznavanje podatkov OECD bo zagotovljeno šele, ko bo predlagana nova ali posodobljena preskusna metoda v skladu s standardi izvajanja pregledana in vključena v ustrezno smernico OECD za preskušanje.

OPREDELITVE POJMOV

6. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku.

ZAČETNI PREUDARKI

7. V validacijski študiji (10) in drugih objavljenih študijah (16) (17) so ugotovili, da se lahko pri preskusni metodi TER na podganji koži razlikuje med znanimi snovmi, ki so jedke za kožo, in znanimi snovmi, ki niso jedke, s splošno 94-odstotno občutljivostjo (51/54) in 71-odstotno specifičnostjo (48/68) za zbirko podatkov o 122 snoveh.

⁽¹⁾ Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 13.12.2008, str. 1).

8. S to preskusno metodo se obravnava jedkost za kožo *in vitro*. Omogoča opredelitev nejedkih in jedkih preskusnih kemikalij v skladu z GHS ZN/uredbo CLP. Kot so pokazale validacijske študije (8) (9) (10) (11), je omejitev te preskusne metode ta, da ne omogoča razvrstitve jedkih snovi in zmesi v podkategorije v skladu z GHS ZN/uredbo CLP. Uporaba te preskusne metode bo odvisna od veljavnega regulativnega okvira. Čeprav ta preskusna metoda ne zagotavlja ustreznih informacij o dražilnosti za kožo, je treba opozoriti, da se s preskusno metodo B.46 izrecno obravnava učinek dražilnosti za kožo *in vitro* na zdravje (5). Za popolno vrednotenje lokalnih učinkov na kožo po enkratni izpostavljenosti kože je treba uporabiti Smernico OECD v zvezi z IATA (6).
9. V validacijski študiji, na kateri temelji ta preskusna metoda, je bil preizkušen širok nabor kemikalij, ki predstavljajo predvsem snovi, v empirično zbirko podatkov validacijske študije pa je vključenih 60 snovi, ki zajemajo najrazličnejše kemijske razrede (8) (9). Na podlagi vseh razpoložljivih podatkov se preskusna metoda uporablja za najrazličnejše kemijske razrede in agregatna stanja, vključno s tekočimi snovmi, poltrdnimi snovmi, trdnimi snovmi in voski. Ker pa za posamezna agregatna stanja preskusne snovi z ustreznimi referenčnimi podatki niso na voljo, je treba opozoriti, da je bilo med validacijo ocenjeno podobno majhno število voskov in jedkih trdnih snovi. Tekoče snovi so lahko vodne raztopine ali ne, trdne snovi so lahko topne ali netopne v vodi. Kadar se lahko dokaže, da preskusne metode ni mogoče uporabljati za posamezno kategorijo snovi, se ta preskusna metoda zanje ne sme uporabiti. Poleg tega se predpostavlja, da se ta preskusna metoda uporablja za zmesi kot razširitev njene uporabe za snovi. Ker pa zmesi zajemajo širok spekter kategorij in sestave in ker so v zvezi s preskušanjem zmesi trenutno na voljo samo omejene informacije, se ta preskusna metoda v primerih, ko se lahko dokaže, da je ni mogoče uporabiti za posamezno kategorijo zmesi (npr. v skladu s strategijo, kot jo predlagajo Eskes *et al.*, 2012) (18), ne sme uporabiti za to posamezno kategorijo zmesi. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki predudarki niso potrebni. Plini in aerosoli še niso bili ocenjeni v validacijskih študijah (8) (9). Čeprav se lahko preskusijo z uporabo preskusne metode TER, veljavna preskusna metoda ne dovoljuje preskušanja plinov in aerosolov.

NAČELO PRESKUSA

10. Preskusna kemikalija se nanese za največ 24 ur na epidermalne površine kožnih ploščic v preskusnem sistemu z dvema komorama, v katerem kožne ploščice delujejo kot pregrada med komorami. Kožne ploščice se odvzamejo s humano usmrčenih podgan, starih 28–30 dni. Jedke kemikalije se opredelijo glede na zmožnost zmanjšati celovitost in pregradno funkcijo rožene plasti pokožnice, ki se meri kot znižanje TER pod raven praga (16) (glej odstavek 32). Za TER na koži podgan je bil na podlagi obsežnih podatkov za širok obseg snovi izbran prag 5 k Ω , kjer je bila velika večina vrednosti precej nad pragom (pogosto > 10 k Ω) ali precej pod njim (pogosto < 3 k Ω) (16). Na splošno preskusne kemikalije, ki niso jedke za živali, ampak so dražilne ali nedražilne, ne znižujejo TER pod ta prag. Prav tako lahko uporaba drugih kožnih pripravkov ali druge opreme spremeni vrednost praga, kar zahteva dodatne validacije.
11. V preskusni postopek je vključena stopnja vezave barvila za potrjevanje pozitivnih rezultatov preskusa TER, kadar so vrednosti okoli 5 k Ω . V stopnji vezave barvila se ugotovi, ali je povečanje ionske prepustnosti posledica fizičnega uničenja rožene plasti pokožnice. Metoda TER je na podganji koži pokazala, da lahko pri kuncih napove jedkost *in vivo*, določeno s preskusno metodo B.4 (2).

DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

12. Pred redno uporabo preskusne metode TER na koži podgan, ki izpolnjuje zahteve te preskusne metode, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno razvrstijo 12 snovi za preverjanje tehnične usposobljenosti, priporočenih v preglednici 1. V primerih, ko snov s seznama ni na voljo ali ko je to utemeljeno, se lahko uporabi druga snov, za katero so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo* in *in vitro* (npr. s seznama referenčnih kemikalij (16)), če se uporabijo enaka merila za izbor, kot so opisana v preglednici 1.

Preglednica 1

Seznam snovi za preverjanje usposobljenosti ⁽¹⁾

Snov	Št. CAS	Kemijski razred ⁽²⁾	GHS ZN/uredba CLP Kat. na podlagi rezultatov <i>in vivo</i> ⁽³⁾	VRM Kat. na podlagi rezultatov <i>in vitro</i>	Agregatno stanje	pH ⁽⁴⁾
Jedke snovi <i>in vivo</i>						
N,N'-dimetil dipropilentriamin	10563-29-8	organska baza	1A	6 × J	tekoče	8,3
1,2-diaminopropan	78-90-0	organska baza	1A	6 × J	tekoče	8,3
Žveplova kislina (10-odstotna)	7664-93-9	anorganska kislina	(1A)/1B/1C	5 × J 1 × x NJ	tekoče	1,2
Kalijev hidroksid (10-odstotni vodni)	1310-58-3	anorganska baza	(1A)/1B/1C	6 × J	tekoče	13,2
Oktanojska (kaprilska) kislina	124-07-2	organska kislina	1B/1C	4 × J 2 × NJ	tekoče	3,6
2-terc-butilfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 × J 2 × NJ	tekoče	3,9
Nejedke snovi <i>in vivo</i>						
Izostearinska kislina	2724-58-5	organska kislina	NJ	6 × NJ	tekoče	3,6
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	organska baza	NJ	6 × NJ	trdno	5,5
Fenetil bromid	103-63-9	elektrofil	NJ	6 × NJ	tekoče	3,6
4-(metiltio)-benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	NJ	6 × NJ	tekoče	6,8
1,9-dekadien	1647-16-1	nevtralna organska snov	NJ	6 × NJ	tekoče	3,9
Tetrakloroetilen	127-18-4	nevtralna organska snov	NJ	6 × NJ	tekoče	4,5

Kratice: aq = vodni; št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); VRM = validirana referenčna metoda; J = jedko; NJ = nejedko.

⁽¹⁾ Snovi za preverjanje usposobljenosti, ki so najprej razvrščene na jedke in nejedke, nato po podkategoriji jedkosti in nazadnje po kemijskem razredu, so bile izbrane med snovmi, uporabljenimi pri validacijski študiji ECVAM v zvezi s preskusno metodo TER na koži podgan (8) (9). Če ni navedeno drugače, so se snovi preskusile pri stopnji čistosti, pri kateri so bile kupljene od komercialnega vira (8). Kolikor je bilo mogoče, so bile v izbor vključene snovi, ki: (i) predstavljajo razpon odzivov jedkosti (npr. snovi, ki niso jedke; snovi, ki so od blago do močno jedke), ki jih je mogoče izmeriti ali napovedati z VRM; (ii) predstavljajo kemijske razrede, uporabljene v validacijski študiji; (iii) kažejo značilnosti delovanja VRM; (iv) imajo dobro opredeljene kemijske strukture; (v) dajejo dokončne rezultate pri referenčni preskusni metodi *in vivo*; (vi) so razpoložljive na trgu in (vii) niso povezane s previsokimi stroški odstranjevanja.

⁽²⁾ Kemijski razred, dodeljen po Barrattu *et al.* (8).

⁽³⁾ Ustrezne embalažne skupine ZN so I, II in III za kategorije 1A, 1B oziroma 1C po GHS ZN/uredbi CLP.

⁽⁴⁾ Vrednosti pH so povzete po Fentemu *et al.* (9) in Barrattu *et al.* (8).

POSTOPEK

13. Na voljo so standardni delovni postopki za preskusno metodo TER v zvezi z jedkostjo za kožo na koži podgan (19). Preskusne metode TER na koži podgan, zajete s to preskusno metodo, morajo izpolnjevati pogoje, navedene v nadaljevanju.

Živali

14. Uporabiti je treba podgane, ker je bila občutljivost kože podgan za snovi pri tej preskusni metodi predhodno dokazana (12) in so edini vir kože, ki je bil uradno validiran (8) (9). Zagotoviti je treba, da so mešički dlak v dormantni fazi, preden se začne rast odraslih dlak, pri čemer sta zlasti pomembna starost (ob odvzemu kože) in sev podgane.
15. Dlaka na hrbtu in bokih mladih približno 22 dni starih samcev ali samic (Wistar ali podobnega seva podgan) se previdno odstrani z majhnimi škarjami. Nato se živali s pazljivim brisanjem umijejo, ostrižena površina pa se potopi v antibiotično raztopino (ki denimo vsebuje streptomycin, penicilin, kloramfenikol in amfotericin v koncentracijah, ki učinkovito preprečujejo rast bakterij). Živali se z antibiotično raztopino ponovno umijejo tretji ali četrti dan po prvem umivanju, uporabijo pa se v 3 dneh po drugem umivanju, ko rožena plast okreva po odstranitvi dlak.

Priprava kožnih ploščic

16. Živali se humano usmrtijo, ko so stare 28–30 dni; ta starost je ključna. Z vsake posamezne živali se nato odstrani hrbtno-bočna koža, s katere se previdno odlušči vsa odvečna podkožna maščoba. Nato se izrežejo kožne ploščice v premeru približno 20 mm. Koža se lahko shrani pred uporabo ploščic, kadar se dokaže, da so podatki pozitivnih in negativnih kontrol enaki kot pri sveži koži.
17. Vsaka kožna ploščica se namesti čez konec cevi iz PTFE (politetrafluoroetilen), pri čemer se mora površina pokožnice dotikati cevi. Čez konec cevi se tesno namesti gumijast obroč, s katerim se koža pričvrsti, nato se obreže odvečno tkivo. Gumijasti obroč se nato z naravnim vazelinom pazljivo pritisne na konec PTFE-cevi. Cev se z vzmetno sponko namesti v receptorsko komoro, ki vsebuje raztopino MgSO_4 (154 mM) (slika 1). Kožne ploščice morajo biti popolnoma potopljene v raztopino MgSO_4 . Iz kože ene podgane je mogoče pridobiti od 10 do 15 kožnih ploščic. Mere cevi in obroča so prikazane na sliki 2.
18. Na dveh kožnih ploščicah iz kože vsake živali se pred začetkom preskušanja za namene kontrole kakovosti izmeri TER. Preostale ploščice se lahko uporabijo pri preskusni metodi, če je električna upornost obeh ploščic večja od 10 k Ω . Če je upornost manjša od 10 k Ω , je treba preostale ploščice, pripravljene iz iste kože, zavreči.

Nanos preskusne kemikalije in kontrolnih snovi

19. Pri vsaki ponovitvi (poskusu) je treba uporabiti istočasne pozitivne in negativne kontrole, da se zagotovi ustreznost izvedbe modela poskusa. Pri vsaki ponovitvi (poskusu) se lahko uporabijo le kožne ploščice ene živali. Predlagana preskusna kemikalija za pozitivno kontrolo je 10-molarna klorovodikova kislina, za negativno kontrolo pa destilirana voda.
20. Tekoče preskusne kemikalije (150 μl) se enakomerno nanesejo na površino pokožnice v cevi. Pri preskušanju trdnega materiala se na kožno ploščico enakomerno nanese dovolj trdne snovi, da se zagotovi, da je prekrita celotna površina pokožnice. Nato se na trdno snov doda deionizirana voda (150 μl), cevka pa se rahlo pretrese. Za največji stik s kožo bo morda treba trdno snov segreti do 30 °C, da se preskusna kemikalija stali ali zmehča, ali zmleti, da nastane granulati ali prašek.

21. Za vsako preskusno in kontrolno kemikalijo se pri vsaki ponovitvi (poskusu) uporabijo tri kožne ploščice. Preskusne kemikalije se za 24 ur nanesejo pri 20–23 °C. Preskusna kemikalija se odstrani tako, da se toliko časa spira s curkom tekoče vode pri največ sobni temperaturi, dokler ni več mogoče odstraniti materiala.

Meritve TER

22. Impedanca kože se izmeri kot TER z Wheatstonovim mostičem nizke napetosti in izmeničnega toka (18). Splošne specifikacije za mostič so: delovna napetost 1–3 volte, izmenični tok 50–1 000 Hz v obliki sinusa ali pravokotnika in merilno območje najmanj 0,1–30 k Ω . Merilni mostič v validacijski študiji je meril induktivnost do 2 000 H, kapacitivnost do 2 000 μ F in upornost do 2 M Ω pri frekvencah 100 Hz ali 1 kHz v zaporednih ali vzporednih meritvah. V preskusu jedkosti TER se meritve evidentirajo v obliki upornosti pri frekvenci 100 Hz in z zaporednimi vrednostmi. Pred merjenjem električne upornosti se površinska napetost kože zmanjša, tako da se doda zadostna količina 70-odstotnega etanola, da prekrije pokožnico. Po nekaj sekundah se etanol odstrani iz cevi, tkivo pa se nato navlaži s 3 ml raztopine MgSO₄ (154 mM). Za merjenje upornosti v k Ω /kožno ploščico se elektrode merilnega mostiča namestijo na vsako stran kožne ploščice (slika 1). Mere elektrod in dolžina elektrode pod krokodilsko sponko so navedene na sliki 2. Sponka notranje (debele) elektrode med merjenjem upornosti leži na vrhu PTFE-cevi, s čimer se zagotovi, da je v raztopino MgSO₄ ves čas potopljena enaka dolžina elektrode. Zunanja elektroda je v receptorski komori, in sicer se dotika njenega dna. Razdalja med vzmetno sponko in dnom PTFE-cevi je konstantna (slika 2), saj ta razdalja vpliva na dobljeno vrednost upornosti. Zato mora biti razdalja med notranjo elektrodo in kožno ploščico konstantna in minimalna (1–2 mm).
23. Če je izmerjeni upor večji od 20 k Ω , je to morda posledica tega, da ostanki preskusne kemikalije prekrivajo površino pokožnice kožne ploščice. Za dodatno odstranitev te plasti se lahko na primer začepi PTFE-cev z orokavičnim palcem in jo stresa približno 10 sekund; raztopina MgSO₄ se zavrže, merjenje upornosti pa se ponovi s svežim MgSO₄.
24. Lastnosti in mere preskusne naprave in uporabljenega poskusnega postopka lahko vplivajo na pridobljene vrednosti TER. Prag za jedkost 5 k Ω je bil ugotovljen na podlagi podatkov, pridobljenih s posebnimi napravami in postopkom, opisanim v tej metodi. Če se preskusni pogoji bistveno spremenijo ali če se uporabi drugačna naprava, lahko veljajo drugačni pragovi in kontrolne vrednosti. Zaradi tega je treba metodologijo in prag upornosti obvezno umerjati s preskušanjem vrste snovi za preverjanje usposobljenosti, ki se izberejo med snovmi, uporabljenimi v validacijski študiji (8) (9), ali skupinami snovi, ki so podobne preskušani. Nabor primernih snovi za preverjanje usposobljenosti je prikazan v preglednici 1.

Metode vezave barvila

25. Izpostavljenost določenim nejedkim materialom lahko povzroči zmanjšanje upornosti pod prag 5 k Ω , pri čemer je omogočen prehod ionov skozi roženo plast in s tem zmanjšanje električne upornosti (9). Npr. nevtralne organske snovi in snovi, ki so površinsko aktivne (med drugim detergenti, emulgatorji in druge površinsko aktivne snovi), lahko odstranjujejo kožne lipide in povzročijo večjo prepustnost za ione. Zato je treba pri vrednostih TER za preskusne kemikalije pod 5 k Ω ali okoli te vrednosti in brez vidnih poškodb kožnih ploščic opraviti oceno penetracije barvila na kontrolnih in tretiranih tkivih, da se ugotovi, ali so vrednosti TER posledica povečane prepustnosti kože ali jedkosti za kožo (7) (9). V slednjem primeru barvilo sulforodamin B pretрга roženo plast, pri čemer barvilo po nanosu na površino kože hitro penetrira in obarva pod njim ležeče tkivo. To specifično barvilo je odporno proti širokemu razponu snovi in nanj ne vpliva ekstrakcijski postopek, opisan spodaj.

Nanos in odstranitev barvila sulforodamin B

26. Po oceni TER se magnezijev sulfat odstrani iz cevi, kožo pa je treba natančno pregledati za vidne poškodbe. Če očitnih večjih poškodb (npr. perforacije) ni, se na površino pokožnice vsake kožne ploščice za 2 uri nanese 150 μ l 10-odstotne (m/V) raztopine barvila sulforodamin B (Acid Red 52; C.I. 45100; št. CAS 3520-42-1) v destilirani vodi. Te kožne ploščice se nato približno 10 sekund spirajo s tekočo vodo pri največ sobni temperaturi, da se odstrani morebitno odvečno/nevezano barvilo. Vsaka kožna ploščica se pazljivo odstrani iz PTFE-cevi in prenese v vialo (npr. 20-mililitrsko stekleničko za scintilacijsko tekočino), ki vsebuje deionizirano

vodo (8 ml). Viale se 5 minut rahlo stresajo, da se odstrani preostalo odvečno nevezano barvilo. Postopek izpiranja se ponovi, nato pa se kožne ploščice odstranijo in prenesejo v vialo, ki vsebujejo 5 ml 30-odstotnega (m/V) natrijevega dodecil sulfata (SDS) v destilirani vodi, ter v inkubatorju čez noč shranijo pri 60 °C.

27. Po inkubaciji se vse kožne ploščice odstranijo in zavržejo, preostala raztopina pa se 8 minut centrifugira pri 21 °C (relativna centrifugalna sila $\sim 175 \times g$). 1 ml vzorca supernatanta se nato razredči v razmerju 1 proti 5 (V/V) (tj. 1 ml + 4 ml) s 30-odstotnim SDS (m/V) v destilirani vodi. Optična gostota raztopine se meri pri 565 nm.

Izračun vsebnosti barvila

28. Vsebnost barvila sulforodamin B v ploščici se izračuna iz vrednosti optične gostote (9) (koeficient molarne ekstinkcije barvila sulforodamin B pri 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekulska masa = 580). Vsebnost barvila se določi za vsako kožno ploščico s pomočjo ustrezne umeritvene krivulje, nato pa se izračuna srednja vrednost vsebnosti barvila za ponovljene vzorce.

Merila za sprejemljivost

29. Povprečni rezultati TER se sprejmejo pod pogojem, da so vrednosti istočasne pozitivne in negativne kontrole v mejah sprejemljivosti za to metodo v preskusnem laboratoriju. Meje sprejemljivosti za metodologijo in naprave, opisane zgoraj, so prikazane v naslednji preglednici.

Kontrola	Snov	Mejni upor (kΩ)
Pozitivna	10-molarna klorovodikova kislina	0,5–1,0
Negativna	destilirana voda	10–25

30. Povprečni rezultati vezanja barvila se sprejmejo, če so vrednosti istočasne kontrole v mejah sprejemljivosti za metodo. Predlagane sprejemljive meje vsebnosti barvila za kontrolne snovi za zgoraj opisano metodologijo in napravo so navedene v spodnji preglednici.

Kontrola	Snov	Meje vsebnosti barvila (µg/košček)
Pozitivna	10-molarna klorovodikova kislina	40–100
Negativna	destilirana voda	15–35

Razlaga rezultatov

31. Mejna vrednost TER, ki se uporablja za razlikovanje med jedkimi in nejedkimi preskusnimi kemikalijami, je bila določena med optimiranjem preskusne metode, preskušena v predvalidacijski fazi in potrjena v uradni validacijski študiji.
32. Napovedni model za preskusno metodo TER v zvezi z jedkostjo za kožo na koži podgan (9) (19), povezan s sistemom za razvrščanje GHS ZN/uredbe CLP, je naveden v nadaljevanju.

Za preskusno kemikalijo se šteje, da ni jedka za kožo:

- i) če je srednja vrednost TER, dobljena za preskusno kemikalijo, večja od ($>$) 5 k Ω ali
- ii) če je srednja vrednost TER, dobljena za preskusno kemikalijo, manjša ali enaka ($\leq$) 5 k Ω in
 - če na kožnih ploščicah ni vidnih poškodb (npr. perforacije) ter
 - je srednja vrednost vsebnosti barvila v kožni ploščici manjša ($<$) od istočasno določene srednje vrednosti vsebnosti barvila v kožni ploščici iz pozitivne kontrole z 10-molarno HCl (za vrednosti pozitivne kontrole glej odstavek 30).

Za preskusno kemikalijo se šteje, da je jedka za kožo:

- i) če je srednja vrednost TER, dobljena za preskusno kemikalijo, manjša ali enaka ($\leq$) 5 k Ω in so kožne ploščice vidno poškodovane (npr. perforirane) ali
 - ii) če je srednja vrednost TER, dobljena za preskusno kemikalijo, manjša ali enaka ($\leq$) 5 k Ω in
 - če na kožnih ploščicah ni vidnih poškodb (npr. perforacije), vendar
 - je srednja vrednost vsebnosti barvila v kožni ploščici večja ali enaka ($\geq$) istočasno določeni srednji vrednosti vsebnosti barvila v kožni ploščici iz pozitivne kontrole z 10-molarno HCl (za vrednosti pozitivne kontrole glej odstavek 30).
33. Kadar je razvrstitev nedvoumna, bi moralo za preskusno kemikalijo zadoščati eno preskušanje (poskus), sestavljeno iz vsaj treh ponovljenih vzorcev kožnih ploščic. V primeru mejnih rezultatov, kot so neskladne ponovne meritve in/ali povprečni TER, enak $5 \pm 0,5$ k Ω , je treba preučiti možnost izvedbe druge neodvisne ponovitve preskušanja (poskusa) in nato še tretje, če so rezultati prvih dveh ponovitev preskušanj (poskusov) neskladni.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

34. Vrednosti upornosti (k Ω), in kadar je primerno, vrednosti vsebnosti barvila (μ g/ploščico) za preskusno kemikalijo skupaj s podatki pozitivnih in negativnih kontrol je treba prikazati v obliki preglednice, vključno s podatki za vsak ponovljeni vzorec ploščice pri vsaki ponovitvi preskušanja (poskusa) in srednjimi vrednostmi $\pm$ standardni odklon. Vse ponovljene poskuse je treba navesti. Za vsako preskusno kemikalijo je treba navesti opažene poškodbe kožnih ploščic.

Poročilo o preskusu

35. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija in kontrolne snovi:

- Snov iz ene sestavine kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

- Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi: čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin;
- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- vir, številka serije, če je na voljo;
- obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);
- stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan;
- pogoji skladiščenja.

Preskusne živali:

- uporabljeni sev in spol;
- starost živali, ko so bile uporabljene kot donorke;
- izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;
- podrobnosti o pripravi kože.

Preskusni pogoji:

- umeritvene krivulje za preskusne aparature;
- umeritvene krivulje za izvedbo preskusa vezave barvila, filtrirana valovna dolžina, uporabljena za merjenje vrednosti optične gostote, in razpon linearosti optične gostote merilne naprave (npr. spektrofotometra), če je primerno;
- podrobnosti o preskusnem postopku, uporabljenem za meritve TER;
- podrobnosti o preskusnem postopku, uporabljenem za oceno vezave barvila, če je primerno;
- uporabljeni preskusni odmerki, trajanje obdobj izpostavljenosti in temperature izpostavljenosti;
- podrobnosti o postopku spiranja, uporabljenem po obdobju izpostavljenosti;
- število ponovljenih vzorcev kožnih ploščic, uporabljenih na preskusno kemikalijo, in kontrol (pozitivnih in negativnih kontrol);
- opis morebitnih prilagoditev preskusnega postopka;

- navedba podatkov o modelu iz preteklih preskusov. To mora med drugim vključevati:
 - i) sprejemljivost vrednosti TER (v k Ω) za pozitivno in negativno kontrolo z navedbo mejnega uporna za pozitivne in negativne kontrole;
 - ii) sprejemljivost vrednosti vsebnosti barvila (v µg/ploščico) za pozitivno in negativno kontrolo z navedbo mej vsebnosti barvila za pozitivno in negativno kontrolo;
 - iii) sprejemljivost rezultatov preskusov z navedbo variabilnosti med ponovljenimi vzorci kožnih ploščic v preteklih preskusih;
- opis uporabljenih meril za odločanje/uporabljenega napovednega modela.

Rezultati:

- preglednice s podatki iz preskusov TER in vezave barvila (če je ustrezno) za posamezne preskusne kemikalije in kontrole, za vsako ponovitev preskušanja (poskusa) in vsak ponovljeni vzorec kožne ploščice (posamezne živali in posamezni vzorci kože), srednje vrednosti, standardni odkloni in koeficienti variacije;
- opis vseh opaženih učinkov;
- izpeljana razvrstitev z navedbo uporabljenega napovednega modela/meril za odločitev.

Razprava o rezultatih

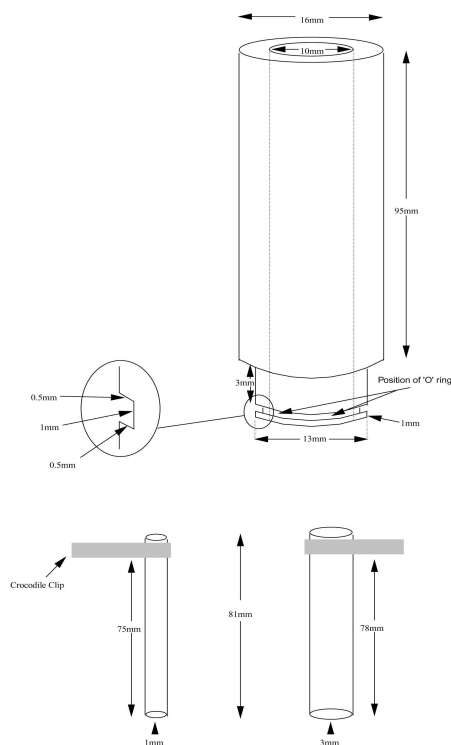
Sklepne ugotovitve

VIRI

- (1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), druga revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva, 2013. Na voljo na: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].
- (2) Poglavje B.4 te priloge, Akutno draženje kože, jedkost za kožo.
- (3) Poglavje B.40a te priloge, Model kože *in vitro*.
- (4) Poglavje B.65 te priloge, Preskusna metoda membranske pregrade *in vitro*.
- (5) Poglavje B.46 te priloge, Draženje kože *in vitro*: preskusna metoda rekonstruirane človeške pokožnice.
- (6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 203), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

- (7) Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hildebrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P., in Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219–255.
- (8) Barratt, M. D., Brantom, P. G., Fentem, J. H., Gerner, I., Walker, A. P., in Worth, A. P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic. In Vitro* 12, 471–482.
- (9) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhütter, H.-G., in Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic. In Vitro* 12, 483–524.
- (10) Balls, M., Blaauboer, B. J., Fentem, J. H., Bruner, L., Combes, R. D., Ekwall, B., Fielder, R. J., Guillouzo, A., Lewis, R. W., Lovell, D. P., Reinhardt, C. A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., in Zucco, F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23, 129–147.
- (11) ICCVAM (Medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. Publikacija NIH št. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, ZDA.
- (12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3. april 1998.
- (13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* 26, 275–280.
- (14) ICCVAM (Medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPI-SKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. Publikacija NIH št. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, ZDA.
- (15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, št. 218. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (16) Oliver, G. J. A., Pemberton, M. A., in Rhodes, C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 507–512.
- (17) Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D. J., in Gardner, J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6, 191–194.
- (18) Eskes, C., Detappe, V., Koëter, H., Kreysa, J., Liebsch, M., Zuang, V., Amcoff, P., Barroso, J., Cotovio, J., Guest, R., Hermann, M., Hoffmann, S., Masson, P., Alépée, N., Arce, L. A., Brüscheweiler, B., Catone, T., Cihak, R., Clouzeau, J., D'Abrosca, F., Delveaux, C., Derouette, J. P., Engelking, O., Facchini, D., Fröhlicher, M., Hofmann, M., Hopf, N., Molinari, J., Oberli, A., Ott, M., Peter, R., Sá-Rocha, V. M., Schenk, D., Tomicic, C., Vanparys, P., Verdon, B., Wallenhorst, T., Winkler, G. C., in Depallens, O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62, 393–403.

Slika 2

Mere uporabljenih cevi iz politetrafluoroetilena (PTFE), receptorskih cevi in elektrod**Ključni dejavniki zgoraj prikazane naprave:**

- Notranji premer PTFE-cevi,
- dolžina elektrod relativno na PTFE-cev in receptorsko cev, tako da se kožna ploščica ne dotika elektrod in da je v stiku z raztopino MgSO_4 standardna dolžina elektrode,
- višina raztopine MgSO_4 v receptorski cevki mora biti relativna na gladino raztopine v PTFE-cevi, kakor je prikazano na sliki 1,
- kožna ploščica mora biti v PTFE-cev dovolj dobro fiksirana, da je električni upor resnično merilo lastnosti kože.

Dodatek

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz 'skladnost' se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (20).

J: jedko.

Kemikalija: snov ali zmes.

Skladnost: je merilo učinkovitosti za preskusne metode, s katerimi se pridobijo kategorični rezultati, in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz točnost se včasih uporabljata kot sopomenki in pomenita delež vseh preskušanih kemikalij, ki so pravilno razvrščene kot pozitivne ali negativne. Skladnost je zelo odvisna od razširjenosti pozitivnih rezultatov v vrstah preučevane preskusne kemikalije (20).

GHS (globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (ZN)): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudje (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment (celostni pristop k testiranju in ocenjevanju).

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

Nj: nejedko.

OD: optična gostota.

PC: pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

Standardi izvajanja (SI): standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi in so podlaga za oceno primerljivosti predlagane preskusne metode, ki je funkcijsko in mehanistično podobna. Vključujejo: (i) nujne elemente preskusne metode; (ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (iii) podobne stopnje zanesljivosti in točnosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, kar mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij.

Ustreznost: opis razmerja med preskusno metodo in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskusna metoda pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Ustreznost upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (20).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oцени se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih (20).

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (20).

Jedkost za kožo in vivo: nastanek nepovračljivih poškodb kože: zlasti vidnega odmiranja prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure. Za reakcije jedkosti so značilne razjede, krvavitve, krvave hraste in do konca 14-dnevnega opazovanja izguba barve zaradi beljenja kože, celi predeli alopecije in brazgotine. Dvournne lezije je morda treba preiskati histopatološko.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (20).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Ponovitev (preskusa): sočasno preskušanje iste preskusne kemikalije na vsaj treh ponovljenih vzorcih kožnih ploščic.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

transkutana električna upornost (TER): merilo električne impedance kože, ki je izražena kot upornost v kiloohmih. Preprosta in robustna metoda za ocenjevanje pregradne funkcije z evidentiranjem prehoda ionov preko kože z napravo z Wheatstonovim mostičem.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.“

(6) Poglavje B.40bis dela B se nadomesti z naslednjim:

„B.40bis **JEDKOST ZA KOŽO IN VITRO: PRESKUSNA METODA REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE**

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 431 (2016). Jedkost za kožo pomeni nastanek nepovračljive poškodbe kože, ki se kaže kot vidno odmiranje prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije (kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) ⁽¹⁾). Pri tej posodobljeni preskusni metodi B.40a se izvede postopek *in vitro*, ki omogoča opredelitev nejedkih in jedkih snovi in zmesi v skladu z GHS ZN in uredbo CLP. Omogoča tudi delno razvrstitev jedkih snovi v podkategorije.
2. Ocena potenciala kemikalij za povzročanje jedkosti za kožo se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali (preskusna metoda B.4, enakovredna Smernici OECD za preskušanje 404, ki je bila prvotno sprejeta leta 1981 ter revidirana v letih 1992, 2002 in 2015) (2). Poleg sedanje preskusne metode B.40a sta bili validirani še dve drugi preskusni metodi *in vitro* za preskušanje potenciala kemikalij za povzročanje jedkosti, ki sta bili sprejeti kot preskusna metoda B.40 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 430) (3) in preskusna metoda B.65 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 435) (4). Poleg tega je bila preskusna metoda *in vitro* B.46 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 439) (5) sprejeta za preskušanje potenciala za draženje kože. V smernici OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi z jedkostjo za kožo in draženjem kože je opisanih več modulov, v katerih so zbrani viri informacij in orodja za analizo, zagotovljene smernice o tem, (i) kako obstoječe podatke, pridobljene s preskušanjem, in podatke, ki ne temeljijo na preskušanju, združiti in uporabiti pri ocenjevanju potenciala kemikalij za draženje kože in povzročanje jedkosti za kožo, (ii) predlagan pa je tudi pristop, kadar je potrebno dodatno preskušanje (6).
3. S to preskusno metodo se obravnava končna točka jedkost za kožo z vidika zdravja ljudi. Pri njej se uporablja rekonstruirana človeška pokožnica (pridobljena iz netransformiranih keratinocitov človeške pokožnice), ki ima zelo podobne histološke, morfološke, biokemijske in fiziološke značilnosti kot zgornji deli človeške kože, tj. pokožnica. Ustrezna smernica OECD za preskušanje je bila prvotno sprejeta leta 2004, leta 2013 je bila posodobljena zaradi vključitve dodatnih preskusnih metod z uporabo modelov rekonstruirane človeške pokožnice in možnosti uporabe metod za pomoč pri razvrščanju jedkih kemikalij v podkategorije, leta 2015 pa je bila posodobljena zaradi sklicevanja na dokument s smernicami IATA in uvedbe uporabe alternativnega postopka za merjenje viabilnosti.
4. V to preskusno metodo so vključeni štirje validirani, na trgu dostopni modeli rekonstruirane človeške pokožnice. Predvalidacijske študije (7), ki jim je sledila uradna validacijska študija za oceno jedkosti za kožo (8) (9) (10), so bile izvedene (11) (12) za dva od teh na trgu dostopnih preskusnih modelov, EpiSkin™ Standard Model (SM) in EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (v nadaljnjem besedilu: validirani referenčni metodi – VRM). Na podlagi rezultatov teh študij je bilo izdano priporočilo, da se lahko obe zgoraj navedeni metodi VRM uporabita za regulativne namene za razlikovanje med jedkimi (J) in nejedkimi (NJ) snovmi ter da se lahko model EpiSkin™ poleg tega uporablja kot pomoč pri razvrščanju jedkih snovi v podkategorije (13) (14) (15). Glede na validacijo na podlagi standardov izvajanja sta podobne rezultate kot VRM EpiDerm™ pokazala še dva druga na trgu dostopna modela rekonstruirane človeške pokožnice za preskušanje jedkosti za kožo *in vitro* (16) (17) (18). To sta SkinEthic™ RHE ⁽²⁾ in epiCS® (ki se je prej imenoval EST-1000), ki ju je prav tako mogoče uporabiti za regulativne namene za razlikovanje med jedkimi in nejedkimi snovmi (19) (20). S povalidacijskimi študijami, ki so jih proizvajalci modela rekonstruirane človeške pokožnice izvedli v obdobju 2012–2014 z izpopolnjenim protokolom za odpravo interferenc nespecifične redukcije MTT s preskusnimi kemikalijami, sta se izboljšali uspešnost razlikovanja med jedkimi in nejedkimi snovmi ter pomoč pri razvrščanju jedkih snovi v podkategorije (21) (22). Opravljene so bile dodatne statistične analize povalidacijskih podatkov, pridobljenih z modeli EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE in EpiCS®, da bi se opredelili alternativni napovedni modeli, s katerimi se je izboljšala napovedna zmogljivost za razvrstitev v podkategorije (23).

⁽¹⁾ Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 13.12.2008, str. 1).

⁽²⁾ Kratica RHE (= Reconstructed human Epidermis (rekonstruirana človeška pokožnica)) se uporablja za vse modele, ki temeljijo na tehnologiji rekonstruirane človeške pokožnice. Kratica RHE, kot se uporablja v povezavi z modelom SkinEthic™, pomeni isto, vendar je kot del imena te posebne preskusne metode, pod katerim se trži, navedena z velikimi črkami.

5. Preden se omogoči uporaba predlagane podobne ali spremenjene preskusne metode z rekonstruirano človeško pokožnico *in vitro* v zvezi z jedkostjo za kožo, ki ni VRM, za regulativne namene, je treba določiti njeno zanesljivost, ustreznost (točnost) in omejitve, kar zadeva predlagano uporabo, da se zagotovi njena podobnost z VRM v skladu s standardi izvajanja (24), navedenimi v skladu z načeli Smernic OECD 34 (25). Medsebojno priznavanje podatkov bo zagotovljeno šele, ko bo predlagana nova ali posodobljena preskusna metoda v skladu s standardi izvajanja pregledana in vključena v ustrezno smernico za preskušanje. Preskusni modeli, vključeni v navedeno smernico za preskušanje, se lahko uporabijo za obravnavanje zahtev držav po rezultatih preskusov v zvezi s preskusno metodo *in vitro* za jedkost za kožo, hkrati pa se izkoristi medsebojno priznavanje podatkov.

OPREDELITVE POJMOV

6. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI

7. Ta preskusna metoda omogoča opredelitev nejedkih in jedkih snovi ter zmesi v skladu z GHS ZN in uredbo CLP. Ta preskusna metoda dodatno pomaga pri razvrstitvi jedkih snovi in zmesi v neobvezno podkategorijo 1A v skladu z GHS ZN (1) ter kombinacijo podkategorij 1B in 1C (21) (22) (23). Omejitev te preskusne metode je, da ne omogoča razlikovanja med podkategorijo snovi, ki so jedke za kožo, 1B in podkategorijo 1C v skladu z GHS ZN in uredbo CLP zaradi omejenega nabora znanih kemikalij, ki so jedke *in vivo*, iz podkategorije 1C. Preskusne modele EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE in epiCS® je mogoče razvrstiti v podkategorije (tj. 1A, 1B ali 1C ali NJ).
8. V validacijski študiji v podporo preskusnim modelom, vključenim v to preskusno metodo, ko se uporabljajo za opredelitev nejedkih in jedkih snovi, je bil preskušen širok nabor kemikalij, ki večinoma predstavljajo posamezne snovi; v empirično zbirko podatkov validacijske študije je vključenih 60 kemikalij, ki zajemajo najrazličnejše kemijske razrede (8) (9) (10). Preskušanje za dokaz občutljivosti, specifičnosti in točnosti preskusa ter njegove obnovljivosti v laboratoriju za razvrstitev v podkategorije so izvedli raziskovalci, ki so razvili preskusno metodo, rezultate pa je pregledala OECD (21) (22) (23). Na podlagi vseh razpoložljivih podatkov se preskusna metoda uporablja za najrazličnejše kemijske razrede in agregatna stanja, vključno s tekočimi snovmi, poltrdnimi snovmi, trdnimi snovmi in voski. Tekoče snovi so lahko vodne raztopine ali ne, trdne snovi so lahko topne ali netopne v vodi. Če je mogoče, je treba trdne snovi pred nanosom zmleti v fin prah; druga predhodna obdelava vzorca ni potrebna. Kadar se lahko dokaže, da preskusnih modelov, vključenih v to preskusno metodo, za posamezno kategorijo preskusnih kemikalij ni mogoče uporabiti, se zanje ne smejo uporabljati. Poleg tega se predpostavlja, da se ta preskusna metoda uporablja za zmesi kot razširitev njene uporabe za snovi. Ker pa zmesi zajemajo širok spekter kategorij in sestave in ker so v zvezi s preskušanjem zmesi trenutno na voljo samo omejene informacije, se ta preskusna metoda v primerih, ko se lahko dokaže, da je ni mogoče uporabiti za posamezno kategorijo zmesi (npr. v skladu s strategijo, kot je predlagana v (26)), za to posamezno kategorijo zmesi ne sme uporabljati. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Plini in aerosoli še niso bili ocenjeni v validacijskih študijah (8) (9) (10). Čeprav se lahko preskusijo z uporabo tehnologije rekonstruirane človeške pokožnice, veljavna preskusna metoda ne dovoljuje preskušanja plinov in aerosolov.
9. Preskusne kemikalije, ki absorbirajo svetlobo v istem razponu kot formazan MTT, in preskusne kemikalije, ki lahko povzročijo neposredno redukcijo vitalnega barvila MTT (glede na formazan MTT), lahko vplivajo na meritve viabilnosti tkiva, zato je treba za popravke uporabiti prilagojene kontrole. Vrsta prilagojenih kontrol, ki so lahko potrebne, je odvisna od vrste interference, ki jo povzroča preskusna kemikalija, in postopka za merjenje formazana MTT (glej odstavke 25–31).

10. Čeprav ta preskusna metoda ne prinaša ustreznih informacij o draženju kože, je treba opozoriti, da se s preskusno metodo B.46 izrecno obravnava učinek draženja kože *in vitro* na zdravje in temelji na istem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice, čeprav uporablja drug protokol (5). Za popolno vrednotenje lokalnih učinkov na kožo po enkratni izpostavljenosti kože je treba uporabiti dokument s smernico OECD v zvezi s celostnimi pristopi k testiranju in ocenjevanju (IATA) (6). Ta pristop IATA vključuje opravljanje preskusov jedkosti za kožo *in vitro* (kot je opisano v tej preskusni metodi) in preskusov draženja kože pred preskušanjem na živih živalih. Razumljivo je, da se pri uporabi človeške kože upoštevajo nacionalna in mednarodna etična načela in pogoji.

NAČELO PRESKUSA

11. Preskusna kemikalija se lokalno nanese na tridimenzionalni model rekonstruirane človeške pokožnice, ki vključuje netransformirane keratinocite pokožnice iz človeškega tkiva, gojene za večplastni, zelo raznolik model človeške pokožnice. Sestavljajo ga organizirane bazalne, spinalne in zrnate plasti ter večplastna rožena plast, ki vključuje medcelične lamelarne maščobne plasti, ki predstavljajo glavne razrede maščob in so podobni strukturi *in vivo*.
12. Preskusna metoda z rekonstruirano človeško pokožnico temelji na predpostavki, da lahko jedke kemikalije prodrejo v roženo plast z difuzijo ali erozijo in so citotoksične za spodaj ležeče plasti celic. Viabilnost celic se meri z encimsko pretvorbo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid, tiazolil modro tetrazol bromid; številka CAS 298-93-1) v soli modrega formazana, katere količina se izmeri po ekstrakciji iz tkiv (27). Jedke kemikalije se opredelijo glede na njihovo zmožnost zmanjšanja viabilnosti celic pod opredeljene vrednosti praga (glej odstavka 35 in 36). Preskusna metoda jedkosti za kožo, ki temelji na rekonstruirani človeški pokožnici, je pokazala, da lahko pri kuncih napove učinke jedkosti za kožo *in vivo* v skladu s preskusno metodo B.4 (2).

DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

13. Pred redno uporabo katerega koli od štirih validiranih preskusnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice, ki izpolnjujejo zahteve te preskusne metode, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno razvrstijo 12 snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v preglednici 1. Če se uporabi metoda za razvrščanje v podkategorije, je treba dokazati tudi pravilno razvrščanje v podkategorije. V primerih, ko snov s seznama ni na voljo ali ko je to utemeljeno, se lahko uporabi druga snov, za katero so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo* in *in vitro* (npr. s seznama referenčnih kemikalij (24)), če se uporabijo enaka merila za izbor, kot so opisana v preglednici 1.

Preglednica 1

Seznam snovi za preverjanje usposobljenosti ⁽¹⁾

Snov	Št. CAS	Kemijski razred ⁽²⁾	Kat. po GHS ZN/uredbi CLP na podlagi rezultatov <i>in vivo</i> ⁽³⁾	VRM Kat. na podlagi Rezultati <i>in vitro</i> ⁽⁴⁾	MTT: MTT ⁽⁵⁾	Agregatno stanje
Podkategorija 1A za jedke snovi <i>in vivo</i>						
Bromoocetna kislina	79-08-3	organska kislina	1A	(3) 1A	—	trdno
Borov trifluorid dihidrat	13319-75-0	anorganska kislina	1A	(3) 1A	—	tekoče
fenol	108-95-2	fenol	1A	(3) 1A	—	trdno
Dikloroacetil klorid	79-36-7	elektrofil	1A	(3) 1A	—	tekoče
Kombinacija podkategorij 1B in 1C za jedke snovi <i>in vivo</i>						
Monohidrat glioksilne kisline	563-96-2	organska kislina	1B in 1C	(3) 1B in 1C	—	trdno

Snov	Št. CAS	Kemijski razred ⁽²⁾	Kat. po GHS ZN/uredbi CLP na podlagi rezultatov <i>in vivo</i> ⁽³⁾	VRM Kat. na podlagi Rezultati <i>in vitro</i> ⁽⁴⁾	MTT: MTT ⁽⁵⁾	Agregatno stanje
Podkategorija 1A za jedke snovi <i>in vivo</i>						
Mlečna kislina	598-82-3	organska kislina	1B in 1C	(3) 1B in 1C	—	tekoče
Etanolamin	141-43-5	organska baza	1B	(3) 1B in 1C	da	viskozno
Klorovodikova kislina (14,4 %)	7647-01-0	anorganska kislina	1B in 1C	(3) 1B in 1C	—	tekoče
Nejedke snovi <i>in vivo</i>						
Fenetil bromid	103-63-9	elektrofil	NJ	(3) NJ	da	tekoče
4-amino-1,2,4-triazol	584-13-4	organska baza	NJ	(3) NJ	—	trdno
4-(metiltio)-benzaldehyd	3446-89-7	elektrofil	NJ	(3) NJ	da	tekoče
Lavrinska kislina	143-07-7	organska kislina	NJ	(3) NJ	—	trdno

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); VRM = validirana referenčna metoda; NJ = nejedko.

⁽¹⁾ Snovi za preverjanje usposobljenosti, ki so najprej razvrščene na jedke in nejedke, nato po podkategoriji jedkosti in nazadnje po kemijskem razredu, so bile izbrane med snovmi, uporabljenimi pri validacijskih študijah ECVAM EpiSkin™ in EpiDerm™ (8) (9) (10), in med povalidacijskimi študijami, temelječimi na podatkih raziskovalcev, ki so razvili EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ in epiCS® (23). Če ni navedeno drugače, so se snovi preskusile pri stopnji čistosti, pri kateri so bile kupljene od komercialnega vira (8) (10). Kolikor je bilo mogoče, so bile v izbor vključene snovi, ki: (i) predstavljajo razpon odzivov jedkosti (npr. snovi, ki niso jedke; snovi, ki so od blago do močno jedke), ki jih je mogoče izmeriti ali napovedati z VRM; (ii) predstavljajo kemijske razrede, uporabljene v validacijskih študijah; (iii) imajo dobro opredeljene kemijske strukture; (iv) povzročajo obnovljive rezultate v VRM; (v) dajejo dokončne rezultate pri referenčni preskusni metodi *in vivo*; (vi) so razpoložljive na trgu in (vii) niso povezane s previsokimi stroški odstranjevanja.

⁽²⁾ Kemijski razred, dodeljen po Barrattu *et al.* (8).

⁽³⁾ Ustrezne embalažne skupine ZN so I, II in III za 1A, 1B oziroma 1C po GHS ZN/uredbi CLP.

⁽⁴⁾ Napovedi VRM *in vitro*, navedene v tej preglednici, so bile dobljene s preskusnimi modeloma EpiSkin™ in EpiDerm™ (VRM) med povalidacijskim preskušanjem, ki so ga izvedli razvijalci preskusne metode.

⁽⁵⁾ Vrednosti viabilnosti, dobljene pri validacijskih študijah jedkosti za kožo Evropskega centa za validacijo alternativnih metod (ECVAM), niso bile popravljene za neposredno redukcijo MTT (v validacijskih študijah niso bile izvedene odmrle kontrole). Vendar so bili povalidacijski podatki, ki so jih zagotovili razvijalci preskusne metode in so predstavljeni v tej preglednici, dobljeni s prilagojenimi kontrolami (23).

14. V okviru dokazovanja usposobljenosti se priporoča, da uporabnik po prejetju preveri pregrado tkiv, kakor to določa proizvajalec modela rekonstruirane človeške pokožnice. To je zlasti pomembno, če tkiva potujejo na dolge razdalje/dalj časa. Potem ko je preskusna metoda uspešno vzpostavljena in je dokazana usposobljenost glede njene uporabe, redno preverjanje tkiv ni več potrebno. Vendar je priporočljivo, da se ob redni uporabi metode še naprej ocenjujejo značilnosti pregrade tkiv v rednih časovnih razmikih.

POSTOPEK

15. V nadaljevanju so na splošno opisani elementi in postopki preskusnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice za ocenjevanje jedkosti za kožo, zajetih s to preskusno metodo. Modele rekonstruirane človeške pokožnice, potrjene kot znanstveno veljavne za uporabo v okviru te preskusne metode, in sicer modele EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE in epiCS® (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33), je mogoče dobiti od komercialnih virov. Za te štiri modele rekonstruirane človeške pokožnice so na voljo standardni delovni postopki (34) (35) (36) (37), njihovi glavni elementi preskusne metode pa so povzeti v Dodatku 2. Priporočljivo je, da se pri izvajanju in uporabi enega od teh modelov v laboratoriju preveri ustreznost standardni delovni postopek. Preskušanje s štirimi preskusnimi modeli rekonstruirane človeške pokožnice, zajetimi s to preskusno metodo, se mora izvajati v skladu z zahtevami, navedenimi v nadaljevanju.

ELEMENTI PRESKUSNE METODE REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE

Splošni pogoji

16. Za rekonstrukcijo epitelijskih celic se uporabijo netransformirani človeški keratinociti. Pod funkcionalno roženo plastjo je več slojev živih epitelijskih celic (bazalna plast, trnasta plast, zrnata plast). Rožena plast mora biti razdeljena na več plasti in vsebovati lipidni profil za močno funkcionalno pregrado za zaustavitev hitre penetracije primerjalnih kemikalij citotoksičnosti, npr. natrijevega dodecil sulfata (SDS) ali Tritona X-100. Pregradna funkcija mora biti dokazana in se lahko oceni z določitvijo koncentracije, pri kateri se zaradi primerjalne kemikalije po določenem času izpostavljenosti zmanjša viabilnost tkiv za 50 % (IC_{50}), ali z določitvijo časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti celic za 50 % (ET_{50}) po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne kemikalije (glej odstavek 18). Zadrževalne značilnosti modela rekonstruirane človeške pokožnice morajo preprečevati prehod materiala okoli rožene plasti v živo tkivo, kar bi preprečilo učinkovitost modelov za raziskovanje v zvezi z izpostavljenostjo kože. V modelu rekonstruirane človeške pokožnice ne sme biti bakterij, virusov, mikoplazme ali gliv.

Pogoji za funkcionalnost*Viabilnost*

17. Analiza, ki se uporablja za kvantifikacijo viabilnosti tkiva, je analiza MTT (27). Viabilne celice konstrukcije tkiva rekonstruirane človeške pokožnice reducirajo vitalno barvilo MTT v oborino modrega formazana MTT, ki se nato ekstrahira iz tkiva z uporabo izopropanola (ali podobnega topila). Optična gostota (OD) izvlečka ekstrakcijskega topila mora biti dovolj majhna, tj. $OD < 0,1$. Ekstrahirani formazan MTT se lahko kvantitativno določi bodisi z uporabo meritve standardne absorbance (OD) bodisi z uporabo postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC (38). Uporabniki modela rekonstruirane človeške pokožnice morajo zagotoviti, da vsaka serija zadevnega modela izpolnjuje merila, določena za negativno kontrolo. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli mora določiti razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice. Razponi sprejemljivosti za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli za štiri validirane preskusne modele rekonstruirane človeške pokožnice, vključene v to preskusno metodo, so navedeni v preglednici 2. Uporabnik spektrofotometrije HPLC/UPLC mora razpone optične gostote pri negativni kontroli, navedene v preglednici 2, uporabiti kot merilo za sprejemljivost negativne kontrole. Evidentirati je treba, da je negativno kontrolno tkivo, kar zadeva celične kulture, v obdobju izpostavljenosti stabilno (meritve optične gostote so podobne).

*Preglednica 2***Razponi sprejemljivosti za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli za kontrolo kakovosti serije**

	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Pregradna funkcija

18. Rožena plast in njena maščobna sestava morata zadostovati za zaustavitev hitre penetracije nekaterih citotoksičnih primerjalnih kemikalij, npr. SDS ali Tritona X-100, kot se ocenjuje z IC_{50} ali ET_{50} (preglednica 3). Pregradno funkcijo vsake serije uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice mora dokazati razvijalec/prodajalec zadevnega modela ob dobavi tkiv končnemu uporabniku (glej odstavek 21).

Morfologija

19. Opravljen mora biti histološki pregled modela rekonstruirane človeške pokožnice za prikaz večplastne strukture, podobne človeški pokožnici, ki vključuje bazalno plast, trnasto plast, zrnato plast in roženo plast ter ima podoben lipidni profil kot človeška pokožnica. Histološki pregled vsake serije uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice, s katerim se dokaže ustrezna morfologija tkiv, mora zagotoviti razvijalec/prodajalec zadevnega modela ob dobavi tkiv končnemu uporabniku (glej odstavek 21).

Obnovljivost

20. Uporabniki preskusnih metod morajo dokazati obnovljivost preskusnih metod v daljšem časovnem obdobju s pozitivnimi in negativnimi kontrolami. Poleg tega se lahko preskusna metoda uporabi samo, če razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice zagotovi podatke, ki dokazujejo obnovljivost v daljšem časovnem obdobju z jedkimi in nejedkimi kemikalijami, na primer s seznama snovi za preverjanje usposobljenosti (preglednica 1). Če se preskusna metoda uporabi za razvrščanje v podkategorije, je treba dokazati tudi obnovljivost v zvezi z razvrščanjem v podkategorije.

Kontrola kakovosti

21. Model rekonstruirane človeške pokožnice se lahko uporabi samo, če razvijalec/dobavitelj dokaže, da vsaka serija zadevnega modela izpolnjuje opredeljena merila za sprostitev proizvodnje, med katerimi so najpomembnejša merila za *viabilnost* (odstavek 17), *pregradno funkcijo* (odstavek 18) in *morfologijo* (odstavek 19). Ti podatki se zagotovijo uporabnikom preskusne metode, da lahko te informacije vključijo v poročilo o preskusu. Za zanesljivo napoved razvrstitve med jedke snovi se lahko štejejo le rezultati, doseženi s tkivi iz serij, potrjenih s kontrolo kakovosti. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za IC₅₀ ali ET₅₀ določi razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice. Razponi sprejemljivosti za štiri validirane preskusne modele so navedeni v preglednici 3.

*Preglednica 3***Merila za kontrolo kakovosti ob sprostitvi serij**

	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiSkin™ (SM) (18-urno tretiranje s SDS) (33)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1-odstotni Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4,0 ure	ET ₅₀ = 8,7 ure
SkinEthic™ RHE (1-odstotni Triton X-100) (35)	ET ₅₀ = 4,0 ure	ET ₅₀ = 10,0 ure
epiCS® (1-odstotni Triton X-100) (36)	ET ₅₀ = 2,0 ure	ET ₅₀ = 7,0 ure

Nanos preskusne kemikalije in kontrolnih kemikalij

22. Za vsako preskusno kemikalijo in kontrole je treba za vsak čas izpostavljenosti uporabiti vsaj dva ponovljena vzorca tkiva. Za tekoče in trdne kemikalije je treba nanesti zadostno količino preskusne kemikalije, da se površina pokožnice enakomerno prekrije, pri čemer mora biti odmerek natančno določen, tj. najmanj 70 µl/cm² ali 30 mg/cm². Odvisno od modela je treba za boljši stik med preskusno kemikalijo in površino pokožnice pred nanosom trdnih kemikalij površino pokožnice navlažiti z deionizirano ali destilirano vodo (34) (35) (36) (37). Če je mogoče, je treba trdne snovi preskusiti v obliki finega prahu. Metoda nanosa mora biti primerna glede na preskusno kemikalijo (glej npr. reference (34–37)). Ob koncu časa izpostavljenosti je treba preskusno kemikalijo

skrbno sprati s pokožnice z vodnim pufrom ali 0,9-odstotnim NaCl. Odvisno od tega, kateri od štirih validiranih preskusnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice se uporabi, se za vsako preskusno kemikalijo uporabita dve ali tri obdobja izpostavljenosti (za vse štiri ustrezne modele rekonstruirane človeške pokožnice: 3 minute in 1 ura; za model EpiSkin™ dodatni čas izpostavljenosti traja 4 ure). Glede na uporabljeni preskusni model rekonstruirane človeške pokožnice in ocenjevano obdobje izpostavljenosti lahko inkubacijska temperatura znaša od sobne temperature do 37 °C.

23. Pri vsaki ponovitvi je treba uporabiti sočasno negativno in pozitivno kontrolo (PC), da se dokaže, da so viabilnost celic (z negativnimi kontrolami), pregradna funkcija in posledična občutljivost tkiva (s PC) v okviru opredeljenega območja sprejemljivosti iz preteklih preskusov. Predlagana kemikalija za pozitivno kontrolo je ledocetna kislina ali 8-normalni KOH, odvisno od uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice. Opozoriti je treba, da je 8-normalni KOH snov, ki neposredno zmanjšuje MTT in ki lahko zahteva prilagajene kontrole, kot je opisano v odstavkih 25 in 26. Predlagani negativni kontroli sta 0,9-odstotni NaCl ali voda.

Meritve viabilnosti celic

24. Analizo MTT, ki je kvantitativna analiza, je treba v okviru te preskusne metode uporabljati za merjenje viabilnosti celic (27). Vzorec tkiva se za 3 ure potopi v ustrezno koncentracijo raztopine MTT (npr. 0,3 ali 1 mg/ml). S topilom (npr. izopropanolom, kislim izopropanolom) se izvleče oborina modrega formazana, potem pa se koncentracija formazana izmeri tako, da se določi optična gostota pri valovni dolžini 570 nm z uporabo filtrirane valovne dolžine največ ± 30 nm, ali z uporabo postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC (glej odstavka 30 in 31) (38).
25. Preskusne kemikalije lahko vplivajo na analizo MTT ali z neposredno redukcijo MTT v modri formazan in/ali z barvno interferenco, če preskusna kemikalija naravno ali zaradi postopkov tretiranja absorbira v istem razponu optične gostote formazana (570 ± 30 nm, predvsem modre in vijoličaste kemikalije). Dodatne kontrole je treba uporabiti, da se zazna in popravi morebitno vplivanje teh preskusnih kemikalij, kot sta kontrola z nespecifično redukcijo MTT (NSMTT) in kontrola z nespecifično barvo (NSC) (glej odstavke od 26 do 30). To je še zlasti pomembno, če se določena preskusna kemikalija z izpiranjem s tkiva ne odstrani v celoti ali če prodre v pokožnico, tako da je med preskusom viabilnosti MTT prisotna v tkivu. Za podrobnejši opis načina popravka neposredne redukcije MTT in vpliva barvil glej standardne delovne postopke za preskusne modele (34) (35) (36) (37).
26. Za opredelitev snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, je treba vsako preskusno kemikalijo dodati sveže pripravljnemu mediju MTT (34) (35) (36) (37). Če se zmes MTT, ki vsebuje preskusno kemikalijo, obarva modro/vijolično, se šteje, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT, zato je treba izvesti dodatno funkcionalno preverjanje na neviabilni pokožnici, in to neodvisno od uporabe meritve standardne absorbance (OD) ali postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC. Pri tem dodatnem funkcionalnem preverjanju se uporabijo odmrli tkiva, ki imajo samo rezidualno presnovno aktivnost, vendar absorbirajo podobno količino preskusne kemikalije kot viabilna tkiva. Vsaka kemikalija, ki zmanjšuje MTT, se nanese na vsaj dva dvojnika odmrlega tkiva za vsak čas izpostavljenosti, nato se na teh dvojnikih opravi celoten preskus jedkosti za kožo. Dejanska viabilnost tkiva se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi snovi, ki zmanjšuje MTT, od katerega se odšteje delež nespecifične redukcije MTT, dobljen z odmrli tkivi, izpostavljenimi isti snovi, ki zmanjšuje MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja (% NSMTT).
27. Za opredelitev morebitnega vplivanja obarvanih preskusnih kemikalij ali preskusnih kemikalij, ki so se obarvale v stiku z vodo ali izopropanolom, in odločitev, ali so potrebne dodatne kontrole, je treba opraviti spektralno analizo preskusne kemikalije v vodi (okolje med izpostavljenostjo) in/ali izopropanolu (raztopina za ekstrakcijo). Če preskusna kemikalija v vodi in/ali izopropanolu absorbira svetlobo v razponu 570 ± 30 nm, je treba izvesti dodatne kontrole z barvilom ali pa uporabiti postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC, pri čemer v tem primeru te kontrole niso potrebne (glej odstavka 30 in 31). Pri izvajanju meritve standardne absorbance (OD) se vsaka moteča obarvana preskusna kemikalija nanese na vsaj dva ponovljena vzorca viabilnega tkiva za vsak čas

izpostavljenosti, nato se na teh ponovljenih vzorcih izvede celoten preskus jedkosti za kožo, vendar se v fazi inkubacije MTT inkubirata z medijem namesto z raztopino MTT, da se ustvari kontrola z nespecifično barvo ($NSC_{\text{živo}}$). Kontrolo z nespecifično barvo ($NSC_{\text{živo}}$) je treba zaradi inherentne biološke variabilnosti živih tkiv izvesti sočasno za vsak čas izpostavljenosti za vsako obarvano preskusno kemikalijo (pri vsaki ponovitvi). Dejanska viabilnost tkiva se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z raztopino MTT, od katerega se odšteje delež nespecifične barve, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z medijem brez MTT, pri čemer se ta preskus izvede sočasno s preskusom, ki se popravlja ($\% NSC_{\text{živo}}$).

28. Pri preskusnih kemikalijah, za katere je ugotovljeno, da neposredno zmanjšujejo MTT (glej odstavek 26) in povzročajo barvno interferenco (glej odstavek 27), je potreben tudi tretji niz kontrol poleg NSMTT in $NSC_{\text{živo}}$, opisanih v prejšnjih odstavkih, ko se izvaja meritev standardne absorbanse (OD). To po navadi velja za temno obarvane preskusne kemikalije, ki motijo analizo MTT (npr. modre, vijoličaste, črne), ker njihova lastna barva ovira oceno njihove zmožnosti za neposredno redukcijo MTT, kot je opisana v odstavku 26. Te preskusne kemikalije se lahko vežejo na živa in odmrta tkiva, zato se s kontrolo NSMTT ne le popravi potencialna neposredna redukcija MTT zaradi preskusne kemikalije, ampak tudi barvna interferenca, ki nastane zaradi vezave preskusne kemikalije na odmrta tkiva. To bi lahko vodilo do dvojnega popravka barvne interference, saj se s kontrolo $NSC_{\text{živo}}$ že popravi barvna interferenca, ki jo povzroča vezava preskusne kemikalije na živa tkiva. Za preprečitev morebitnega dvojnega popravka barvne interference je treba izvesti še tretjo kontrolo za nespecifično barvo v odmrlih tkivih (NSC_{odmrlo}). Pri tej dodatni kontroli se preskusna kemikalija nanese na vsaj dva ponovljena vzorca odmrlega tkiva za vsak čas izpostavljenosti, nato pa se na teh ponovljenih vzorcih izvede celoten postopek preskušanja, pri čemer pa se v fazi inkubacije MTT inkubirajo z medijem namesto z raztopino MTT. Za vsako preskusno kemikalijo zadostuje ena sama kontrola NSC_{odmrlo} ne glede na število izvedenih neodvisnih preskusov/ponovitev, vendar jo je treba izvesti sočasno s kontrolo NSMTT in po možnosti z isto serijo tkiva. Dejanska viabilnost tkiva se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, od katerega se odštejeta $\% NSMTT$ in $\% NSC_{\text{živo}}$, prišteje pa se mu delež nespecifične barve, dobljen z odmrli tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z medijem brez MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja ($\% NSC_{\text{odmrlo}}$).
29. Pomembno je poudariti, da se lahko zaradi nespecifične redukcije MTT in nespecifičnih barvnih interferenc povečajo odčitki izvlečka tkiva nad razponom linearnosti spektrofotometra. Na tej podlagi mora vsak laboratorij najprej določiti razpon linearnosti svojega spektrofotometra s formazanom MTT (št. CAS 57360-69-7) iz komercialnega vira, šele nato lahko začne preskušanje preskusnih kemikalij za regulativne namene. Natančneje, meritev standardne absorbanse (OD) z uporabo spektrofotometra je ustrezna za oceno preskusnih kemikalij, ki neposredno zmanjšujejo MTT in povzročajo barvno interferenco, ko so optične gostote izvlečkov tkiv, dobljene s preskusno kemikalijo brez kakršnega koli popravka za neposredno redukcijo MTT in/ali barvno interferenco, znotraj linearnega razpona spektrofotometra ali ko nepopravljeni delež viabilnosti, dobljen s preskusno kemikalijo, to že opredeljuje kot jedko (glej odstavka 35 in 36). Vendar je treba rezultate za preskusne kemikalije, ki povzročajo $\% NSMTT$ in/ali $\% NSC_{\text{živo}} > 50 \%$ negativne kontrole, obravnavati previdno.
30. Za obarvane preskusne kemikalije, ki zaradi premočnega vplivanja na analizo MTT niso združljive z meritvijo standardne absorbanse (OD), se lahko uporabi alternativni postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC za merjenje formazana MTT (glej odstavek 31) (37). Sistem spektrofotometrije HPLC/UPLC omogoča, da se formazan MTT loči od preskusne kemikalije pred njegovo kvantifikacijo (38). Iz tega razloga kontrole $NSC_{\text{živo}}$ ali NSC_{odmrlo} pri uporabi spektrofotometrije HPLC/UPLC niso nikoli potrebne, in to ne glede na to, katera kemikalija se preskuša. Kljub temu je treba kontrole NSMTT uporabiti v primeru suma, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT ali da njena barva ovira oceno sposobnosti za neposredno redukcijo MTT (kot je opisano v odstavku 26). Kadar se za merjenje formazana MTT uporabi spektrofotometrija HPLC/UPLC, se delež viabilnosti tkiva izračuna kot razmerje med površino vrha formazana MTT, dobljeno z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, in površino vrha formazana MTT, dobljeno s sočasno negativno kontrolo. Za preskusne kemikalije, ki lahko neposredno zmanjšajo MTT, se dejanska viabilnost tkiva izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi

tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, od katerega se odšteje % NSMTT. Nazadnje, opozoriti je treba, da snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT in lahko povzročijo tudi barvno interferenco ter ki ostanejo v tkivih po tretiranju in zmanjšujejo MTT tako močno, da optične gostote (z uporabo standardne meritve optične gostote) ali površine vrha (z uporabo spektrofotometrije UPLC/HPLC) preskušanih izvlečkov tkiv, ki presegajo razpon linearnosti spektrofotometra, ni mogoče oceniti, čeprav naj bi se to zgodilo samo v zelo redkih primerih.

31. Spektrofotometrija HPLC/UPLC se lahko uporabi tudi z vsemi vrstami preskusnih kemikalij (obarvanimi, neobarvanimi, kemikalijami, ki zmanjšujejo MTT, in tistimi, ki ne zmanjšujejo MTT) za merjenje formazana MTT (38). Zaradi raznovrstnosti sistemov spektrofotometrije HPLC/UPLC je treba ustreznost sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC dokazati pred njegovo uporabo za kvantifikacijo formazana MTT iz izvlečkov tkiv, tako da izpolnjuje merila za sprejemljivost za niz standardnih parametrov ustreznosti na podlagi tistih, ki so opisani v smernicah ameriške uprave za hrano in zdravila za industrijo (U.S. Food and Drug Administration) v zvezi z bioanalitično metodo validacije (38) (39). Ti ključni parametri in njihova merila za sprejemljivost so prikazani v Dodatku 4. Ko so izpolnjena merila za sprejemljivost, opredeljena v Dodatku 4, se sistem spektrofotometrije HPLC/UPLC šteje za ustrezen in je pripravljen za merjenje formazana MTT v poskusnih pogojih, opisanih v tej preskusni metodi.

Merila za sprejemljivost

32. Za vsako preskusno metodo, pri kateri se uporabljajo veljavni modeli rekonstruirane človeške pokožnice, morajo negativna kontrolna tkiva izražati optično gostoto, iz katere je razvidna kakovost tkiv, kot je opisana v preglednici 2 in ki ne sme biti nižja od mej, določenih s preteklimi preskusi. Iz tkiv, tretiranih s pozitivno kontrolo, tj. ledocetno kislino ali 8-normalnim KOH, mora biti razvidna sposobnost tkiv, da se odzovejo na jedko kemikalijo v pogojih preskusnega modela (glej Dodatek 2). Variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv preskusne kemikalije in/ali kontrolnih kemikalij mora biti znotraj sprejemljivih mej za zahteve vsakega ustreznega modela rekonstruirane človeške pokožnice (glej Dodatek 2) (npr. razlika v viabilnosti med dvema ponovljenim vzorcema tkiva ne sme presegati 30 %). Če negativna ali pozitivna kontrola, vključena v ponovitev, ni znotraj sprejemljivih razponov, se ponovitev šteje za neveljavno in jo je treba ponoviti. Če je variabilnost preskusnih kemikalij zunaj opredeljenega razpona, je treba njeno preskušanje ponoviti.

Razlaga rezultatov in napovedni model

33. Vrednosti optične gostote, pridobljene za vsako preskusno kemikalijo, je treba uporabiti za izračun deleža viabilnosti celic glede na negativno kontrolo, katere viabilnost znaša 100 %. Če se uporabi spektrofotometrija HPLC/UPLC, se delež viabilnosti tkiva izračuna kot delež površine vrha formazana MTT, dobljene z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, glede na vrh formazana MTT, dobljen s sočasno negativno kontrolo. V spodnjih odstavkih 35 in 36 so za vsak preskusni model, zajet s to preskusno metodo, opredeljene mejne vrednosti deleža viabilnosti celic, ki se uporabljajo za razlikovanje med jedkimi in nejedkimi preskusnimi kemikalijami (ali za razlikovanje med različnimi podkategorijami jedkosti), ki jih je treba uporabiti pri razlagi rezultatov.
34. Kadar je razvrstitev nedvoumna, bi morale za preskusno kemikalijo zadoščati eno samo preskušanje, sestavljeno iz vsaj dveh ponovljenih vzorcev tkiv. V primeru mejnih rezultatov, kot so neskladne ponovne meritve, je morda treba preučiti drugo preskušanje in nato še tretje, če rezultati prvih dveh preskušanj niso skladni.

35. Napovedni model za preskusni model EpiSkin™ za jedkost za kožo (9) (34) (22), povezan s sistemom za razvrščanje GHS ZN/uredbe CLP, je prikazan v preglednici 4.

Preglednica 4

Napovedni model EpiSkin™

Viabilnost, izmerjena po časovnih točkah izpostavljenosti (t = 3, 60 in 240 minut)	Napoved, ki se upošteva
< 35-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	Jedko: • Neobvezna podkategorija 1A (*)
≥ 35-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti IN < 35-odstotna po 60-minutni izpostavljenosti ALI ≥ 35-odstotna po 60-minutni izpostavljenosti IN < 35-odstotna po 240-minutni izpostavljenosti	Jedko: • Kombinacija neobveznih podkategorij 1B in 1C
≥ 35-odstotna po 240-minutni izpostavljenosti	Nejedka snov

(*) Glede na podatke, ustvarjene za presojo koristnosti preskusnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice za pomoč pri razvrščanju v podkategorije, se je pokazalo, da približno 22 % rezultatov iz podkategorije 1A preskusnega modela EpiSkin™ dejansko lahko predstavlja snovi/zmesi iz podkategorije 1B ali 1C (tj. razvrstitve v previsoko podkategorijo) (glej Dodatek 3).

36. Napovedni modeli za preskusne modele jedkosti za kožo EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) in epiCS® (16) (23) (37), povezani s sistemom za razvrščanje GHS ZN/uredbe CLP, so prikazani v preglednici 5.

Preglednica 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE in epiCS®

Viabilnost, izmerjena po časovnih točkah izpostavljenosti (t = 3 in 60 minut)	Napoved, ki se upošteva
1. KORAK za EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE in epiCS®	
< 50-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	Jedka snov
≥ 50-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti IN < 15-odstotna po 60-minutni izpostavljenosti	Jedka snov
≥ 50-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti IN ≥ 15-odstotna po 60-minutni izpostavljenosti	Nejedka snov
2. KORAK za EpiDerm™ SCT – za snovi/zmesi, v 1. koraku opredeljene kot jedke	
< 25-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	Neobvezna podkategorija 1A *

Viabilnost, izmerjena po časovnih točkah izpostavljenosti (t = 3 in 60 minut)	Napoved, ki se upošteva
1. KORAK za EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE in epiCS®	
≥ 25-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	Kombinacija neobveznih podkategorij 1B in 1C
2. KORAK za SkinEthic™ RHE – za snovi/zmesi, v 1. koraku opredeljene kot jedke	
< 18-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	Neobvezna podkategorija 1A *
≥ 18-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	Kombinacija neobveznih podkategorij 1B in 1C
2. KORAK za epiCS® – za snovi/zmesi, v 1. koraku opredeljene kot jedke	
< 15-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	Neobvezna podkategorija 1A *
≥ 15-odstotna po 3-minutni izpostavljenosti	Kombinacija neobveznih podkategorij 1B in 1C

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

37. Za vsako preskušanje je treba podatke o posameznih ponovljenih vzorcih tkiv (npr. vrednosti optične gostote in izračunani delež viabilnih celic za vsako preskusno kemikalijo, vključno z razvrstitvijo) v poročilu navesti v obliki preglednice, po potrebi vključno s podatki iz ponovljenih poskusov. Poleg tega je treba v poročilu za vsak preskus navesti srednje vrednosti in razpone viabilnosti in KV med ponovljenimi vzorci tkiv. Za vsako preskusno kemikalijo je treba navesti opažene interakcije med reagentom MTT in snovmi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, ali obarvanimi preskusnimi kemikalijami.

Poročilo o preskusu

38. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija in kontrolne kemikalije:

- Snov iz ene sestavine kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.
- Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi: čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin;
- fizični videz, topnost v vodi in morebitne dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;
- vir, številka serije, če je na voljo;
- obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);
- stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan;

— pogoji skladiščenja.

Uporabljena model in protokol rekonstruirane človeške pokožnice ter njuna utemeljitev (če je ustrezno)

Preskusni pogoji:

— uporabljeni model rekonstruirane človeške pokožnice (vključno s številko serije);

— podatki o umerjanju za merilno napravo (npr. spektrofotometer), valovna dolžina in filtrirana valovna dolžina (če je ustrezno), ki se uporabljajo za kvantifikacijo formazana MTT, ter razpon linearnosti merilne naprave;

— opis metode, uporabljene za kvantifikacijo formazana MTT;

— opis ustreznosti sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC, če je ustrezno;

— popolne informacije v podporo specifičnemu uporabljenemu modelu rekonstruirane človeške pokožnice, vključno z njegovo učinkovitostjo. To mora med drugim vključevati:

i) viabilnost;

ii) pregradno funkcijo;

iii) morfologijo;

iv) obnovljivost in napovedljivost;

v) kontrole kakovosti modela;

— navedba podatkov o modelu iz preteklih preskusov. To mora med drugim vključevati sprejemljivost podatkov o kontroli kakovosti s sklicevanjem na podatke o seriji, pridobljene v preteklosti;

— dokaz o usposobljenosti za izvajanje preskusne metode pred redno uporabo s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti.

Preskusni postopek:

— podrobnosti o uporabljenem preskusnem postopku (vključno s postopki spiranja, ki se uporabijo po obdobju izpostavljenosti);

— odmerki uporabljene preskusne kemikalije in kontrolnih kemikalij;

— trajanje obdobja izpostavljenosti in temperature izpostavljenosti;

— navedba kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšajo MTT, in/ali barvilnih preskusnih kemikalij, če je ustrezno;

- število ponovljenih vzorcev tkiv, uporabljenih za vsako preskusno kemikalijo in kontrole (pozitivna kontrola, negativna kontrola in NSMTT, NSCživo in NSCodmrlo, če je ustrezno), za vsak čas izpostavljenosti;
- opis uporabljenih meril za odločanje/napovednega modela na podlagi uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice;
- opis morebitnih prilagoditev preskusnega postopka (vključno s postopki spiranja).

Merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa:

- srednje vrednosti pozitivne in negativne kontrole ter razponi sprejemljivosti na podlagi podatkov iz preteklih preskusov;
- sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za pozitivne in negativne kontrole;
- sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za preskusno kemikalijo.

Rezultati:

- preglednice s podatki o posameznih preskusnih kemikalijah in kontrolah za vsako obdobje izpostavljenosti, vsako ponovitev preskusa in vsako ponovljeno meritev, vključno z optično gostoto ali površino vrha formazana MTT, deležem viabilnosti tkiv, povprečnim deležem viabilnosti tkiv, razlikami med ponovljenimi vzorci, standardnimi odkloni in/ali KV, če je ustrezno;
- če je ustrezno, rezultati kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in/ali barvilne preskusne kemikalije, vključno z optično gostoto ali površino vrha formazana MTT, % NSMTT, % NSCživo, % NSCodmrlo, razlikami med ponovljenimi vzorci tkiv, standardnimi odkloni in/ali KV (če je ustrezno), ter končni pravilni delež viabilnosti tkiv;
- rezultati, dobljeni s preskusnimi kemikalijami in kontrolnimi kemikalijami, glede na opredeljena merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa;
- opis drugih opaženih učinkov;
- izpeljana razvrstitev z navedbo uporabljenega napovednega modela/meril za odločitev.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

VIRI

- (1) ZN (2013). Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). Peta revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) Poglavje B.4 te priloge, Akutno draženje kože, jedkost za kožo.
- (3) Poglavje B.40 te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*.

- (4) Poglavje B.65 te priloge, Preskusna metoda membranske pregrade *in vitro*.
- (5) Poglavje B.46 te priloge, Draženje kože *in vitro*: preskusna metoda rekonstruirane človeške pokožnice.
- (6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 203), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (7) Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hildebrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P., in Balls, M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23:219–255.
- (8) Barratt, M. D., Brantom, P. G., Fentem, J. H., Gerner, I., Walker, A. P., in Worth, A. P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12:471–482.
- (9) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhutter, H.-G., in Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol. In Vitro* 12:483–524.
- (10) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M., in Holzhütter, H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.
- (11) Balls, M., Blaauboer, B. J., Fentem, J. H., Bruner, L., Combes, R. D., Ekwall, B., Fielder, R. J., Guillouzo, A., Lewis, R. W., Lovell, D. P., Reinhardt, C. A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., in Zucco, F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, *ATLA* 23:129–147.
- (12) ICCVAM (Medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. Publikacija NIH št. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, ZDA.
- (13) ICCVAM (Medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. Publikacija NIH št. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NJ, ZDA.
- (14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3. april 1998.
- (15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21. marec 2000.
- (16) Hoffmann, J., Heisler, E., Karpinski, S., Losse, J., Thomas, D., Siefken, W., Ahr, H. J., Vohr, H. W., in Fuchs, H. W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. In Vitro* 19: 925-929.

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

- (31) Tinois, E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M., in Thivolet, J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310–319.
- (32) Parenteau, N. L., Bilbo, P., Nolte, C. J., Mason, V. S., in Rosenberg, M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.
- (33) Wilkins, L. M., Watson, S. R., Prosky, S. J., Meunier, S. F., in Parenteau, N. L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747–756.
- (34) EpiSkin™ SOP (december 2011). INVITTOX Protocol (št. 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.
- (35) EpiDerm™ SOP (februar 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.
- (36) SkinEthic™ RHE SOP (januar 2012). INVITTOX Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.
- (37) EpiCS® SOP (januar 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.
- (38) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K. R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., in McNamee, P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.
- (39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (maj 2001). Na voljo na: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz 'skladnost' se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (25).

Viabilnost celic: parameter za merjenje celotne dejavnosti celične populacije, npr. zmožnosti celičnih mitohondrijskih dehidrogenaz za redukcijo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil modro), ki se glede na izmerjeno končno točko in uporabljeni načrt preskusa ujema s skupnim številom in/ali viabilnostjo živih celic.

Kemikalija: snov ali zmes.

Skladnost: je merilo učinkovitosti za preskusne metode, s katerimi se pridobijo kategorični rezultati, in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz točnost se včasih uporabljata kot sopomenki in pomenita delež vseh preskušanih kemikalij, ki so pravilno razvrščene kot pozitivne ali negativne. Skladnost je zelo odvisna od razširjenosti pozitivnih rezultatov v vrstah preučevane preskusne kemikalije (25).

ET₅₀: lahko se oceni z določanjem časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti celic za 50 % po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne kemikalije, glej tudi IC₅₀.

GHS (globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography).

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment (celostni pristop k testiranju in ocenjevanju).

IC₅₀: lahko se oceni z določanjem koncentracije, pri kateri primerjalna kemikalija po določenem času izpostavljenosti zmanjša viabilnost tkiv za 50 % (IC₅₀), glej tudi ET₅₀.

Prevelik odmerek: količina na pokožnico nanese preskusne kemikalije, ki je večja od količine, potrebne za celotno in enakomerno prekritje površine pokožnice.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi, ki v njej ne reagirajo.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

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

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

NJ: nejedko.

Kontrola NSC_{odmrlo}: kontrola z nespecifično barvo v odmrlih tkivih.

Kontrola NSC_{živo}: kontrola z nespecifično barvo v živih tkivih.

NSMTT: nespecifična redukcija MTT.

OD: optična gostota.

PC: pozitivna kontrola, ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s kemikalijo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

Standardi izvajanja (SI): standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi in so podlaga za oceno primerljivosti predlagane preskusne metode, ki je funkcijsko in mehanistično podobna. Vključujejo: (i) nujne elemente preskusne metode; (ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (iii) podobne stopnje zanesljivosti in točnosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, ki jih mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (25).

Ustreznost: opis razmerja med preskusno metodo in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskusna metoda pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Ustreznost upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (25).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih (25).

Ponovitev: ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušanih sočasno z negativno kontrolo in pozitivno kontrolo.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (25).

Jedkost za kožo*in vivo*: nastanek nepovračljivih poškodb kože: zlasti vidnega odmiranja prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure. Za reakcije jedkosti so značilne razjede, krvavitve, krvave hraste in do konca 14-dnevnega opazovanja izguba barve zaradi beljenja kože, celi predeli alopecije in brazgotine. Dvournne lezije je morda treba preiskati histopatološko.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (25).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UPLC: tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (Ultra-High Performance Liquid Chromatography).

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

Dodatek 2

GLAVNI ELEMENTI PRESKUSNIH MODELOV REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE, VALIDIRANIH ZA PRESKUŠANJE JEDKOSTI ZA KOŽO

Elementi preskusnega modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Površina modela	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²
Število ponovljenih vzorcev tkiv	Najmanj 2 za vsak čas izpostavljenosti.	2–3 za vsak čas izpostavljenosti.	Najmanj 2 za vsak čas izpostavljenosti.	Najmanj 2 za vsak čas izpostavljenosti.
Odmerki pri tretiranju in nanos	<u>Tekočine in viskozne snovi:</u> 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm²). <u>Trdne snovi:</u> 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ± 5 µl raztopine NaCl (9 g/l). <u>Voskaste/lepljive snovi:</u> 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) z najlonsko mrežico.	<u>Tekočine:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²) z najlonsko mrežico ali brez nje. <u>Preverjanje združljivosti preskusne kemikalije z najlonsko mrežico pred preskusom.</u> <u>Poltrdne snovi:</u> 50 µl (79,4 µl/cm²) <u>Trdne snovi:</u> 25 µl H₂O (ali več, če je potrebno) + 25 mg (39,7 mg/cm²). <u>Voski:</u> ploščat 'kolustast' kos premera približno 8 mm, nameščen na vrhu tkiva, namočenega v 15 µl H₂O.	<u>Tekočine in viskozne snovi:</u> 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm²) z uporabo najlonske mrežice. <u>Preverjanje združljivosti preskusne kemikalije z najlonsko mrežico pred preskusom.</u> <u>Trdne snovi:</u> 20 µl ± 2 µl H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²). <u>Voskaste/lepljive snovi:</u> 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) z uporabo najlonske mrežice.	<u>Tekočine:</u> 50 µl (83,3 µl/cm²) z uporabo najlonske mrežice. <u>Preverjanje združljivosti preskusne kemikalije z najlonsko mrežico pred preskusom.</u> <u>Poltrdne snovi:</u> 50 µl (83,3 µl/cm²) <u>Trdne snovi:</u> 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl H₂O (ali več, če je potrebno). <u>Voskaste snovi:</u> ploščat okrogel kos premera približno 8 mm, nameščen na vrhu tkiva, namočenega v 15 µl H₂O.

Elementi preskusnega modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	ePiCS®
Predhodno preverjanje neposredne redukcije MTT	50 µl (tekočina) ali 20 mg (trdna snov)+ 2 ml MTT 0,3 mg/ml raztopine 180 ± 5 min pri 37 °C, 5 % CO ₂ , 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrli v vodi.	50 µl (tekočina) ali 25 mg (trdna snov)+ 1 ml MTT 1 mg/ml raztopine 60 min pri 37 °C, 5 % CO ₂ , 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrli zaradi zamrznitve.	40 µl (tekočina) ali 20 mg (trdna snov)+ 1 ml MTT 1 mg/ml raztopine 180 ± 15 min pri 37 °C, 5 % CO ₂ , 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrli zaradi zamrznitve.	50 µl (tekočina) ali 25 mg (trdna snov)+ 1 ml MTT 1 mg/ml raztopine 60 min pri 37 °C, 5 % CO ₂ , 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrli zaradi zamrznitve.
Predhodno preverjanje barvne interference	10 µl (tekočina) ali 10 mg (trdna snov) + 90 µl H ₂ O se 15 min mešata pri sobni temperaturi → če se raztopina obarva, je treba izvesti prilagojene kontrole z živimi tkivi.	50 µl (tekočina) ali 25 mg (trdna snov) + 300 µl H ₂ O 60 min pri 37 °C, 5 % CO ₂ , 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva, je treba izvesti prilagojene kontrole z živimi tkivi.	40 µl (tekočina) ali 20 mg (trdna snov) + 300 µl H ₂ O se 60 min mešata pri sobni temperaturi → če je preskusna kemikalija obarvana, je treba izvesti prilagojene kontrole z živimi tkivi.	50 µl (tekočina) ali 25 mg (trdna snov) + 300 µl H ₂ O 60 min pri 37 °C, 5 % CO ₂ , 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva, je treba izvesti prilagojene kontrole z živimi tkivi.
Izpostavljenost in temperatura izpostavljenosti	3 min, 60 min (± 5 min) in 240 min (± 10 min) v prezračevanem prostoru, sobna temperatura (18–28 °C).	3 min pri sobni temperaturi in 60 min pri 37 °C, 5 % CO ₂ , 95-odstotna relativna vlažnost	3 min pri sobni temperaturi in 60 min pri 37 °C, 5 % CO ₂ , 95-odstotna relativna vlažnost	3 min pri sobni temperaturi in 60 min pri 37 °C, 5 % CO ₂ , 95-odstotna relativna vlažnost
Spiranje	25 ml 1x PBS (2 ml/posamezno spiranje).	20-krat z neprekinjenim rahlim curkom 1x PBS.	20-krat z neprekinjenim rahlim curkom 1x PBS.	20-krat z neprekinjenim rahlim curkom 1x PBS.

Elementi preskusnega modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Negativna kontrola	50 µl raztopine NaCl (9 g/l) preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.	50 µl H ₂ O preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.	40 µl H ₂ O preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.	50 µl H ₂ O preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.
Pozitivna kontrola	50 µl ledocetne kisline preskuša se samo 4 ure.	50 µl 8-normalnega KOH preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.	40 µl 8-normalnega KOH preskuša se samo 1 uro.	50 µl 8-normalnega KOH preskušeno z vsakim časom izpostavljenosti.
Raztopina MTT	2 ml 0,3 mg/ml.	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml
Čas in temperatura inkubacije MTT	180 min (± 15 min) pri 37 °C, 5 % CO ₂ , 95-odstotna relativna vlažnost.	180 min pri 37 °C, 5 % CO ₂ , 95-odstotna relativna vlažnost.	180 min (±15 min) pri 37 °C, 5 % CO ₂ , 95-odstotna relativna vlažnost.	180 min pri 37 °C, 5 % CO ₂ , 95-odstotna relativna vlažnost.
Ekstrakcijsko topilo	500 µl nakisanega izopropanola (0,04 N HCl v izopropanolu) (izolirano tkivo v celoti potopljeno).	2 ml izopropanola (ekstrakcija iz zgornjega in spodnjega dela vstavka).	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija iz zgornjega in spodnjega dela vstavka).	2 ml izopropanola (ekstrakcija iz zgornjega in spodnjega dela vstavka).
Čas in temperatura ekstrakcije	Čez noč pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo.	Čez noč brez stresanja pri sobni temperaturi ali 120 min s stresanjem (~ 120 vrt/min) pri sobni temperaturi.	Čez noč brez stresanja pri sobni temperaturi ali 120 min s stresanjem (~ 120 vrt/min) pri sobni temperaturi.	Čez noč brez stresanja pri sobni temperaturi ali 120 min s stresanjem (~ 120 vrt/min) pri sobni temperaturi.

Elementi preskusnega modela	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	ePiCS®
Odčitek optične gostote	570 nm (545–595 nm) brez referenčnega filtra	570 nm (ali 540 nm) brez referenčnega filtra	570 nm (540–600 nm) brez referenčnega filtra	540–570 nm brez referenčnega filtra
Kontrola kakovosti tkiva	18-urno tretiranje s SDS 1,0 mg/ml $\leq$ IC ₅₀ $\leq$ 3,0 mg/ml.	Tretiranje z Tritonom X-100 1-odstotnim 4,08 ure $\leq$ ET ₅₀ $\leq$ 8,7 ure.	Tretiranje z Tritonom X-100 1-odstotnim 4,0 ure $\leq$ ET ₅₀ $\leq$ 10,0 ure.	Tretiranje z Tritonom X-100 1-odstotnim 2,0 ure $\leq$ ET ₅₀ $\leq$ 7,0 ure.
Merila za sprejemljivost	1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo (NaCl), mora biti $\geq$ 0,6 in $\leq$ 1,5 za vsak čas izpostavljenosti. 2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 4 ure izpostavljenih pozitivni kontroli (ledocetna kislina), izražena kot delež negativne kontrole, mora biti $\leq$ 20 %. 3. V razponu 20–100-odstotne viabilnosti in za optične gostote $\geq$ 0,3 razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv ne sme presegati 30 %.	1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo (H₂O), mora biti $\geq$ 0,8 in $\leq$ 2,8 za vsak čas izpostavljenosti. 2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 1 uro izpostavljenih pozitivni kontroli (8-normalni KOH), izražena kot delež negativne kontrole, mora biti $\leq$ 15 %. 3. V razponu 20–100-odstotne viabilnosti mora biti koeficient variacije (KV) med ponovljenimi vzorci tkiv $\leq$ 30 %.	1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo (H₂O), mora biti $\geq$ 0,8 in $\leq$ 3,0 za vsak čas izpostavljenosti. 2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 1 uro (in 4 ure, če je to ustrezno) izpostavljenih pozitivni kontroli (8-normalni KOH), izražena kot delež negativne kontrole, mora biti $\leq$ 15 %. 3. V razponu 20–100-odstotne viabilnosti in za optične gostote $\geq$ 0,3 razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv ne sme presegati 30 %.	1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo (H₂O), mora biti $\geq$ 0,8 in $\leq$ 2,8 za vsak čas izpostavljenosti. 2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 1 uro izpostavljenih pozitivni kontroli (8-normalni KOH), izražena kot delež negativne kontrole, mora biti $\leq$ 20 %. 3. V razponu 20–100-odstotne viabilnosti in za optične gostote $\geq$ 0,3 razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv ne sme presegati 30 %.

Dodatek 3

UČINKOVITOST PRESKUSNIH MODELOV PRI RAZVRŠČANJU V PODKATEGORIJE

V spodnji preglednici je prikazana učinkovitost štirih preskusnih modelov, izračunana na podlagi skupine 80 kemikalij, ki so jih preskusili razvijalci štirih preskusov. Izračune je opravil sekretariat OECD, pregledala in potrdila pa jih je podskupina strokovnjakov (21) (23).

Preskusni modeli EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ in epiCS® omogočajo razvrščanje v podkategorije (tj. 1A, 1B ali 1C ali NJ).

Učinkovitosti, stopnje razvrstitve v previsoko podkategorijo, stopnje razvrstitve v prenizko podkategorijo in točnost (napovedovalna zmogljivost) štirih preskusnih modelov na podlagi skupine 80 kemikalij, ki so bile vse preiskane z dvema ali tremi ponovitvami pri vsakem preskusnem modelu, so navedene v spodnji preglednici.

STATISTIČNI PODATKI O NAPOVEDIH, DOBLJENIH NA PODLAGI CELOTNE SKUPINE KEMIKAJIJ				
(n = 80 kemikalij, preiskanih v dveh neodvisnih ponovitvah za epiCS® ali treh neodvisnih ponovitvah za EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ in SkinEthic™ RHE, tj. 159 (*) oziroma 240 razvrstitev)				
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Razvrstitve v previsoko podkategorijo:				
1B in 1C previsoko razvrščeni v podkategorijo 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NJ previsoko razvrščena v podkategoriji 1B in 1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NJ previsoko razvrščena v podkategorijo 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Popr. razvrstitev v previsoko podkat.	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Skupna stopnja razvrstitve v previsoko podkategorijo (vse kategorije)	17,9 %	23,3 %	24,5 %	25,8 %
Razvrstitve v prenizko podkategorijo:				
1A prenizko razvrščena v podkategoriji 1B in 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A prenizko razvrščena v podkategorijo NJ	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B in 1C prenizko razvrščeni v podkategorijo NJ	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Skupna stopnja razvrstitve v prenizko podkategorijo (vse kategorije)	3,3 %	2,5 %	5,4 %	4,4 %
Pravilne razvrstitve v podkategorije:				
Pravilna razvrstitev v podkategorijo 1A	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
Pravilna razvrstitev v podkategorijo 1B in/ali 1C	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Pravilna razvrstitev v podkategorijo NJ	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Splošna točnost	78,8 %	74,2 %	70 %	69,8 %

NC: Nejedka snov

(*) Ena kemikalija se je pri epiCS® preskusila enkrat, ker ni bila na voljo (23).

Dodatek 4

Ključni parametri in merila sprejemljivosti za ustreznost sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC za merjenje formazana MTT, ekstrahirane iz tkiva rekonstruirane človeške pokožnice

Parameter	Protokol, izpeljan iz smernic FDA (37) (38)	Merila za sprejemljivost
Selektivnost	Analiza izopropanola, živega slepega vzorca (izvleček izopropanola iz živih tkiv rekonstruirane človeške pokožnice brez kakršnega koli tretiranja), odmrlega slepega vzorca (izvleček izopropanola iz odmrlih tkiv rekonstruirane človeške pokožnice brez kakršnega koli tretiranja).	$Površina_{interferenca} \leq 20 \%$ $površine_{LLOQ}^{(1)}$.
Natančnost	Kontrole kakovosti (tj. formazan MTT pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml in 160 µg/ml) v izopropanolu (n = 5).	$KV \leq 15 \%$ ali $\leq 20 \%$ za LLOQ.
Točnost	Kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	$\% Dev \leq 15 \%$ ali $\leq 20 \%$ za LLOQ.
Vpliv matriksa	Kontrole kakovosti v živem slepem vzorcu (n = 5).	$85 \% \leq \text{vpliv matriksa} \% \leq 115 \%$.
Prenos	Analiza izopropanola po standardu ULOQ ⁽²⁾ .	$Površina_{interferenca} \leq 20 \%$ $površine_{LLOQ}$.
Obnovljivost (znotraj dneva)	3 neodvisne umeritvene krivulje (na podlagi 6 zaporednih tretjinskih razredčin formazana MTT v izopropanolu, ki se začnejo pri ULOQ, tj. 200 µg/ml); kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	Umeritvene krivulje: $\% Dev \leq 15 \%$ ali $\leq 20 \%$ za LLOQ. Kontrole kakovosti: $\% Dev \leq 15 \%$ in $KV \leq 15 \%$.
Obnovljivost (med dnevi)	1. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 2. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 3. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3).	
Kratkoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruirane človeške pokožnice	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po 24 urah hrambe pri sobni temperaturi.	$\% Dev \leq 15 \%$.
Dolgoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruirane človeške pokožnice, če je potrebno	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po več dneh hrambe pri določeni temperaturi (npr. 4 °C, -20 °C, -80 °C).	$\% Dev \leq 15 \%$.

⁽¹⁾ LLOQ: spodnja meja določljivosti (Lower Limit of Quantification), opredeljena tako, da zajema 1–2-odstotno viabilnost tkiva, tj. 0,8 µg/ml.

⁽²⁾ ULOQ: zgornja meja določljivosti (Upper Limit of Quantification), opredeljena tako, da je vsaj dvakrat višja od najvišje pričakovane koncentracije formazana MTT v izvlečkih izopropanola iz negativnih kontrol, tj. 200 µg/ml.

(7) Poglavje B.46 dela B se nadomesti z naslednjim:

„B.46 PRESKUS DRAŽENJA KOŽE IN VITRO: PRESKUSNA METODA REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 439 (2015). Draženje kože pomeni nastanek povračljive poškodbe kože po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure (kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) ⁽¹⁾). Pri tej preskusni metodi se izvede postopek *in vitro*, ki se lahko uporablja za opredeljevanje nevarnosti dražilnih kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP (2). V regijah, ki niso sprejele neobvezne kategorije 3 po GHS ZN (blage dražilne snovi), se lahko ta preskusna metoda uporabi tudi za opredelitev nerazvrščenih kemikalij. Zato se lahko – odvisno od regulativnega okvira in uporabljenega sistema razvrščanja – ta preskusna metoda uporablja za ugotavljanje dražilnosti kemikalij za kožo kot samostojen nadomestni preskus za preskušanje draženja kože *in vivo* ali kot delni nadomestni preskus v okviru strategije preskušanja (3).
2. Ocena draženja kože se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali (preskusna metoda B.4, enakovredna Smernici OECD za preskušanje 404, ki je bila prvotno sprejeta leta 1981 ter revidirana v letih 1992, 2002 in 2015) (4). Za preskušanje jedkosti so bile tri validirane preskusne metode *in vitro* sprejete kot preskusna metoda EU B.40 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 430), preskusna metoda B.40a (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 431) in preskusna metoda B.65 (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 435) (5) (6) (7). V dokumentu o smernici OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi z jedkostjo za kožo in draženjem kože je opisanih več modulov, v katerih so zbrani viri informacij in orodja za analizo, zagotovljene smernice o tem, (i) obstoječe podatke, pridobljene s preskušanjem, in podatke, ki ne temeljijo na preskušanju, združiti in uporabiti pri ocenjevanju potenciala kemikalij za draženje kože in jedkost za kožo, (ii) predlagan pa je tudi pristop, kadar je potrebno dodatno preskušanje (3).
3. S to preskusno metodo se obravnava končna točka draženje kože z vidika zdravja ljudi. Temelji na preskusnem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice *in vitro*, ki ima zelo podobne biokemijske in fiziološke značilnosti kot zgornji deli človeške kože, tj. pokožnica. Pri preskusnem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice se netransformirani keratinociti pokožnice iz človeškega tkiva uporabijo kot vir celic za rekonstrukcijo modela pokožnice z reprezentativno histologijo in citoarhitekturo. Na voljo so standardi izvajanja, da se olajšata validacija in ocena podobnih in spremenjenih preskusnih metod, temelječih na rekonstruirani človeški pokožnici, v skladu z načeli iz Smernice OECD 34 (8) (9). Ustrezna smernica za preskušanje je bila prvotno sprejeta leta 2010, leta 2013 je bila posodobljena zaradi vključitve dodatnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice, leta 2015 pa je bila posodobljena zaradi sklicevanja na dokument s smernicami IATA in uvedbe uporabe alternativnega postopka za merjenje viabilnosti.
4. Predvalidacijske, optimizacijske in validacijske študije so bile dokončane za štiri preskusne modele *in vitro*, ki so na voljo na trgu (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) in temeljijo na preskusnem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice (80-odstotna občutljivost, 70-odstotna specifičnost in 75-odstotna točnost). Ti štirje preskusni modeli so vključeni v to preskusno metodo in navedeni v Dodatku 2, ki vsebuje tudi informacije o vrsti validacijske študije, uporabljeni za validacijo posamezne preskusne metode. Kot je opozorjeno v Dodatku 2, je bila za razvoj te preskusne metode in standardov izvajanja uporabljena validirana referenčna metoda (VRM) (8).
5. Medsebojno priznavanje podatkov OECD bo zagotovljeno le za preskusne modele, validirane v skladu s standardi izvajanja (8), če je te preskusne modele pregledala in sprejela OECD. Preskusni modeli, vključeni v to preskusno metodo, in ustrezne smernice OECD za preskušanje se lahko brez razlik uporabljajo za obravnavanje zahtev držav po rezultatih preskusov iz preskusnih metod dražilnosti za kožo *in vitro*, hkrati pa se izkoristi medsebojno priznavanje podatkov.
6. Opredelitve pojmov, uporabljenih v tem dokumentu, so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

7. Omejitev preskusne metode, kot jo je pokazala celovita prospektivna validacijska študija, s katero so se ocenile in opredelile preskusne metode rekonstruirane človeške pokožnice (16), je, da ne omogoča razvrščanja kemikalij v neobvezno kategorijo 3 po GHS ZN (blage dražilne snovi) (1). Tako bo način uporabe te preskusne metode odvisen od regulativnega okvira v državah članicah. Za EU v uredbi CLP ni bila uvedena kategorija 3. Za popolno vrednotenje lokalnih učinkov na kožo po enkratni izpostavljenosti kože je treba uporabiti dokument s smernico OECD v zvezi s celostnimi pristopi k testiranju in ocenjevanju (IATA) (3). Razumljivo je, da se pri uporabi človeške kože upoštevajo nacionalna in mednarodna etična načela in pogoji.

⁽¹⁾ Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

8. S to preskusno metodo se obravnava končna točka draženje kože z vidika zdravja ljudi. Čeprav ta preskusna metoda ne zagotavlja ustreznih informacij o jedkosti za kožo, je treba opozoriti, da preskusna metoda B.40a (enakovredna Smernici OECD za preskušanje 431) v zvezi z jedkostjo za kožo temelji na istem preskusnem sistemu rekonstruirane človeške pokožnice, čeprav uporablja drug protokol (6). Ta preskusna metoda temelji na modelih rekonstruirane človeške pokožnice, ki uporabljajo človeške keratinocite in tako predstavljajo *in vitro* ciljni organ želene vrste. Poleg tega neposredno vključuje prvo stopnjo kaskadne reakcije vnetja/mehanizma delovanja (poškodba celic in tkiva, posledica pa je lokalizirana poškodba), do katere pride med draženjem *in vivo*. V validacijski študiji, na kateri temelji ta preskusna metoda, so bile preskušene številne kemikalije, v zbirko podatkov validacijske študije pa je skupno vključenih 58 kemikalij (16) (18) (23). Ta preskusna metoda se uporablja za trdne snovi, tekočine, poltrdne snovi in voske. Tekoče snovi so lahko vodne raztopine ali ne, trdne snovi so lahko topne ali netopne v vodi. Če je mogoče, je treba trdne snovi pred nanosom zmleti v fin prah; druga predhodna obdelava vzorca ni potrebna. Plini in aerosoli še niso bili ocenjeni v validacijski študiji (29). Čeprav se lahko preskusijo z uporabo tehnologije rekonstruirane človeške pokožnice, veljavna preskusna metoda ne dovoljuje preskušanja plinov in aerosolov.
9. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Ker pa zmesi zajemajo širok spekter kategorij in sestave in ker so v zvezi s preskušanjem zmesi trenutno na voljo samo omejene informacije, se ta preskusna metoda v primerih, ko se lahko dokaže, da je ni mogoče uporabiti za posamezno kategorijo zmesi (npr. v skladu s strategijo, kot jo predlagajo Eskes *et al.*, 2012) (30), ne sme uporabljati za to posamezno kategorijo zmesi. Podobna previdnost je potrebna, če se za določene kemijske razrede ali fizikalno-kemijske lastnosti ugotovi, da se ne uporabljajo za to preskusno metodo.
10. Preskusne kemikalije, ki absorbirajo svetlobo v enakem razponu kot formazan MTT, in preskusne kemikalije, ki lahko povzročijo neposredno redukcijo vitalnega barvila MTT (glede na formazan MTT), lahko vplivajo na meritve viabilnosti celic, zato je treba za popravke uporabiti prilagojene kontrole (glej odstavke 28–34).
11. Kadar je razvrstitev nedvoumna, bi moralo za preskusno kemikalijo zadoščati eno samo preskušanje, sestavljeno iz treh ponovljenih vzorcev tkiv. V primeru mejnih rezultatov, kot so neskladne ponovne meritve in/ali povprečni delež viabilnosti, enak $50 \pm 5 \%$, pa je morda treba preučiti drugo preskušanje in nato še tretje, če so rezultati prvih dveh preskušanj neskladni.

NAČELO PRESKUSA

12. Preskusna kemikalija se lokalno nanese na tridimenzionalni model rekonstruirane človeške pokožnice, ki vključuje netransformirane keratinocite človeške pokožnice, gojene za večplastni, zelo raznolik model človeške pokožnice. Sestavljajo ga organizirane bazalne, spinalne in zrnate plasti ter večplastna rožena plast, ki vključuje medcelične lamelarne maščobne plasti, ki predstavljajo glavne razrede maščob in so podobni strukturi *in vivo*.
13. S kemikalijami izzvano draženje kože, ki se pokaže predvsem v obliki rdečine in otekline, je rezultat kaskadnih reakcij, ki se začnejo s prodiranjem kemikalij skozi roženo plast, kjer lahko poškodujejo spodaj ležeče plasti keratinocitov in drugih kožnih celic. Poškodovane celice bodisi sprostijo vnetne posrednike bodisi sprožijo kaskadne reakcije vnetja, ki deluje tudi na celice v usnjici, zlasti na celice strome in endotelne celice krvnih žil. Zaradi razširitve in povečane prepustnosti endotelnih celic nastane opazna rdečina in oteklina (29). S preskusnimi metodami na podlagi rekonstruirane človeške pokožnice se zaradi neobstoja kakršne koli vaskularizacije v preskusnem sistemu *in vitro* merijo zlasti začetni dogodki v kaskadni reakciji, npr. poškodbe celic/tkiv (16) (17), pri čemer se kot odčitek uporablja celična viabilnost.
14. Viabilnost celic v modelih rekonstruirane človeške pokožnice se meri z encimsko pretvorbo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil modro; številka CAS 298-93-1) v soli modrega formazana, katere količina se izmeri po ekstrakciji iz tkiv (31). Dražilne kemikalije se opredelijo glede na njihovo zmožnost zmanjšanja viabilnosti celic pod opredeljene vrednosti praga (tj. $\leq 50 \%$, za kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP). Odvisno od regulativnega okvira in uporabnosti preskusne metode se lahko preskusne kemikalije, ki vplivajo na viabilnost celic nad opredeljeno vrednostjo praga, štejejo za nedražilne snovi (tj. $> 50 \%$, brez kategorije).

DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

15. Pred redno uporabo katerega koli od štirih validiranih preskusnih modelov, ki izpolnjujejo zahteve te preskusne metode (Dodatek 2), morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da uporabijo deset snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v preglednici 1. V primerih, ko snov s seznama na primer ni na voljo, se lahko uporabi druga snov, za katero so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo* in *in vitro* (npr. s seznama referenčnih kemikalij (8)), če se uporabijo enaka merila za izbor, kot so opisana v preglednici 1. Uporabo druge snovi za preverjanje usposobljenosti je treba utemeljiti.
16. V okviru preskušanja usposobljenosti je priporočljivo, da uporabniki po prejetju preverijo pregrado tkiv, kakor to določa proizvajalec modela rekonstruirane človeške pokožnice. To je zlasti pomembno, če tkiva potujejo na dolge razdalje/dalj časa. Potem ko je preskusna metoda uspešno vzpostavljena ter je pridobljena in dokazana usposobljenost za njeno uporabo, tako redno preverjanje ni več potrebno. Vendar je priporočljivo, da se ob redni uporabi metode še naprej ocenjujejo značilnosti pregrade tkiv v rednih časovnih razmikih.

Preglednica 1

Snovi za preverjanje usposobljenosti ⁽¹⁾

Snov	ŠT. CAS	Rezultat <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Agregatno stanje	Kategorija po GHS ZN
------	---------	--	------------------	----------------------

NERAZVRŠČENE SNOVI (brez kategorije po GHS ZN)

Naftalen ocetna kislina	86-87-3	0	trdno	brez kat.
Izopropanol	67-63-0	0,3	tekoče	brez kat.
Metil stearat	112-61-8	1	trdno	brez kat.
Heptil butirat	5870-93-9	1,7	tekoče	brez kat. (neobvezna kat. 3) ⁽³⁾
Heksil salicilat	6259-76-3	2	tekoče	brez kat. (neobvezna kat. 3) ⁽³⁾

RAZVRŠČENE SNOVI (kategorija 2 po GHS ZN)

Ciklamen aldehyd	103-95-7	2,3	tekoče	kat. 2
1-bromoheksan	111-25-1	2,7	tekoče	kat. 2
Kalijev hidroksid (5-odstotni vodni)	1310-58-3	3	tekoče	kat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	3,3	trdno	kat. 2
Heptanal	111-71-7	3,4	tekoče	kat. 2

⁽¹⁾ Snovi za preverjanje usposobljenosti so podskupina snovi, ki se uporabljajo v validacijski študiji, njihova izbira pa temelji na naslednjih merilih: (i) kemikalije so na voljo na trgu; (ii) predstavljajo celoten niz rezultatov Draizovega preskusa draženja kože (od nedražilnih do zelo dražilnih); (iii) njihova kemična struktura je natančno opredeljena; (iv) predstavljajo kemijsko delovanje, ki je uporabljeno v validacijskem postopku; (v) zagotovile so ponovljive rezultate *in vitro* pri večkratnih preskušanjih in v več laboratorijih; (vi) pravilno so bile napovedane *in vitro* ter (vii) se ne povezujejo z zelo toksičnim profilom (npr. rakotvornim ali toksičnim za reprodukcijski sistem) ali previsokimi stroški odstranjevanja.

⁽²⁾ Rezultat *in vivo* v skladu s preskusno metodo B.4 (4).

⁽³⁾ V okviru te preskusne metode se neobvezna kategorija 3 po GHS ZN (blage dražilne snovi) (1) šteje kot „Brez kategorije“.

POSTOPEK

17. V nadaljevanju so opisani elementi in postopki za oceno razdraženosti kože s preskusno metodo rekonstruirane človeške pokožnice (glej tudi Dodatek 3 za parametre, povezane z vsakim preskusnim modelom). Na voljo so standardni delovni postopki za vse štiri modele, ki ustrezajo tej preskusni metodi (32) (33) (34) (35).

ELEMENTI PRESKUSNE METODE REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE

Splošni pogoji

18. Za rekonstrukcijo epitelijskega tkiva je treba uporabiti netransformirane človeške keratinocite. Pod funkcionalno roženo plastjo mora biti več slojev živih epitelijskih celic (bazalna plast, trnasta plast, zrnata plast). Rožena plast mora biti razdeljena na več plasti in vsebovati lipidni profil za močno funkcionalno pregrado za zaustavitev hitre penetracije citotoksičnih primerjalnih kemikalij, npr. natrijevega dodecil sulfata (SDS) ali Tritona X-100. Pregradna funkcija mora biti dokazana in se lahko oceni z določitvijo koncentracije, pri kateri primerjalna kemikalija po določenem času izpostavljenosti zmanjša viabilnost tkiv za 50 % (IC_{50}), ali z določitvijo časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti celic za 50 % (ET_{50}) po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne kemikalije. Zadrževalne značilnosti modela rekonstruirane človeške pokožnice morajo preprečevati prehod materiala okoli rožene plasti v živo tkivo, kar bi preprečilo učinkovitost modelov za raziskovanje v zvezi z izpostavljenostjo kože. V modelu rekonstruirane človeške pokožnice ne sme biti bakterij, virusov, mikoplazme ali gliv.

Pogoji za funkcionalnost*Viabilnost*

19. Analiza, ki se uporablja za kvantifikacijo viabilnosti, je analiza MTT (31). Viabilne celice konstrukcije tkiva rekonstruirane človeške pokožnice lahko reducirajo vitalno barvilo MTT v oborino modrega formazana MTT, ki se nato ekstrahira iz tkiva z uporabo izopropanola (ali podobnega topila). Optična gostota (OD) izvlečka ekstrakcijskega topila mora biti dovolj majhna, tj. $OD < 0,1$. Ekstrahirani formazan MTT se lahko kvantitativno določi bodisi z uporabo meritve standardne absorbanse (OD) bodisi z uporabo postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC (36). Uporabniki modela rekonstruirane človeške pokožnice morajo zagotoviti, da vsaka serija zadevnega modela izpolnjuje merila, določena za negativno kontrolo. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli (v pogojih preskusne metode za draženje kože) določi razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice. Razponi sprejemljivosti za štiri validirane modele rekonstruirane človeške pokožnice, vključene v to preskusno metodo, so navedeni v preglednici 2. Uporabnik spektrofotometrije HPLC/UPLC mora razpone optične gostote pri negativni kontroli, navedene v preglednici 2, uporabiti kot merilo za sprejemljivost negativne kontrole. Evidentirati je treba, da so tkiva, tretirana z negativno kontrolo, obstojna v kulturi (meritve viabilnosti so podobne) med celotnim trajanjem preskusnega obdobja izpostavljenosti.

*Preglednica 2***Razponi sprejemljivosti za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli preskusnih modelov, vključenih v to preskusno metodo**

	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiSkin™ (SM)	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	$\geq 0,8$	$\leq 2,8$
SkinEthic™ RHE	$\geq 0,8$	$\leq 3,0$
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	$\geq 0,7$	$\leq 2,5$

Pregradna funkcija

20. Rožena plast in njena maščobna sestava morata zadostovati za zaustavitev hitre penetracije citotoksičnih primerjalnih kemikalij, npr. SDS ali Tritona X-100, kot se ocenjuje z IC_{50} ali ET_{50} (preglednica 3).

Morfologija

21. Zagotovljen mora biti histološki pregled modela rekonstruirane človeške pokožnice za prikaz strukture, podobne človeški pokožnici (vključno z večplastno roženo plastjo).

Obnovljivost

22. Rezultati pozitivnih in negativnih kontrol preskusne metode morajo dokazovati obnovljivost v daljšem časovnem obdobju.

Kontrola kakovosti

23. Model rekonstruirane človeške pokožnice se lahko uporabi samo, če razvijalec/dobavitelj dokaže, da vsaka serija modela rekonstruirane človeške pokožnice izpolnjuje opredeljena merila za sprostitev proizvodnje, med katerimi so najpomembnejša merila za *viabilnost* (odstavek 19), *pregradno funkcijo* (odstavek 20) in *morfologijo* (odstavek 21). Te podatke je treba zagotoviti uporabnikom preskusne metode, da lahko te informacije vključijo v poročilo o preskusu. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za IC₅₀ ali ET₅₀ mora določiti razvijalec/dobavitelj modela rekonstruirane človeške pokožnice. Za zanesljivo napoved razvrstitve med dražilne snovi se lahko upoštevajo le rezultati, doseženi z ustreznimi tkivi. Razponi sprejemljivosti za štiri preskusne modele, vključene v to preskusno metodo, so navedeni v preglednici 3.

*Preglednica 3***Merila za kontrolo kakovosti ob sprostitvi serij preskusnih modelov, vključenih v to preskusno metodo**

	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiSkin™ (SM) (18-urno tretiranje s SDS) (32)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1-odstotni Triton X-100) (33)	ET ₅₀ = 4,0 ure	ET ₅₀ = 8,7 ure
SkinEthic™ RHE (1-odstotni Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4,0 ure	ET ₅₀ = 10,0 ure
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18-urno tretiranje s SDS) (35)	IC ₅₀ = 1,4 mg/ml	IC ₅₀ = 4,0 mg/ml

Nanos preskusne kemikalije in kontrolnih kemikalij

24. Za vsako preskusno kemikalijo in kontrole pri vsaki ponovitvi je treba uporabiti vsaj tri ponovljene vzorce. Pri tekočih in trdnih kemikalijah je treba nanesti zadostno količino preskusne kemikalije, da se enakomerno prekrije površina pokožnice, pri čemer mora biti odmerek natančno določen, tj. od 26 do 83 µl/cm² ali mg/cm² (glej Dodatek 3). Za boljši stik med preskusno kemikalijo in površino pokožnice je treba v primeru trdnih kemikalij površino pokožnice pred nanosom navlažiti z deionizirano ali destilirano vodo. Če je mogoče, je treba trdne snovi preskusiti v obliki finega prahu. V nekaterih primerih se lahko kot pomoč za porazdelitev uporabi najlonska mrežica (glej Dodatek 3). Ob koncu časa izpostavljenosti je treba preskusno kemikalijo skrbno sprati s površine pokožnice z vodnim pufrom ali 0,9-odstotnim NaCl. Odvisno od uporabljenih preskusnih modelov rekonstruirane človeške pokožnice čas izpostavljenosti traja 15–60 minut, inkubacijska temperatura pa znaša 20–37 °C. Ti časi in temperature izpostavljenosti so optimirani za vsako posamezno preskusno metodo rekonstruirane človeške pokožnice ter predstavljajo različne bistvene lastnosti preskusnih modelov (npr. pregradno funkcijo) (glej Dodatek 3).
25. V vsaki ponovitvi je treba uporabiti sočasno negativno (NC) in pozitivno kontrolo (PC), da se dokaže, da so viabilnost celic (pri NC), pregradna funkcija in posledična občutljivost tkiv (pri PC) v okviru opredeljenega območja sprejemljivosti iz preteklih preskusov. Predlagana snov za pozitivno kontrolo je 5-odstotni vodni SDS. Predlagani snovi za negativno kontrolo sta voda ali fosfatni pufer s soljo (PBS).

Meritve viabilnosti celic

26. Glede na postopek preskušanja je bistveno, da se viabilnost celic ne meri takoj po izpostavljenosti preskusni kemikaliji, ampak v svežem gojišču po dovolj dolgi inkubacijski dobi po tretiranju izpranega tkiva. Ta čas omogoča izboljšanje stanja, kar zadeva šibke citotoksične vplive, in pojav jasnih citotoksičnih vplivov. Ugotovljeno je bilo, da je 42-urna inkubacijska doba po tretiranju optimalna med optimiranjem preskusa dveh od preskusnih modelov na podlagi rekonstruirane človeške pokožnice, na katerih temelji ta preskusna metoda (11) (12) (13) (14) (15).
27. Analiza MTT je standardizirana kvantitativna metoda, ki jo je treba v okviru te preskusne metode uporabljati za merjenje viabilnosti celic. Ustreza uporabi tridimenzionalne konstrukcije tkiva. Vzorec tkiva se za 3 ure potopi v ustrezno koncentracijo raztopine MTT (npr. 0,3–1 mg/ml). Viabilne celice MTT pretvorijo v modri formazan. S topilom (npr. izopropanolom, kislim izopropanolom) se iz tkiva pridobi oborina modrega formazana, potem pa se koncentracija formazana izmeri tako, da se določi optična gostota pri valovni dolžini 570 nm z uporabo filtrirane valovne dolžine največ ± 30 nm, ali s postopkom spektrofotometrije HPLC/UPLC (glej odstavek 34) (36).
28. Optične lastnosti preskusne kemikalije ali njenega kemijskega delovanja na MTT lahko ovirajo analizo (npr. kemikalije lahko preprečijo obarvanje ali povzročijo, da se razlikuje od običajnega, lahko pa ga tudi povzročijo), zaradi česar je lahko ocena viabilnosti celic nepravilna. To se lahko zgodi, če se določena preskusna kemikalija z izpiranjem ne odstrani s kože v celoti ali če prodre v pokožnico. Če preskusna kemikalija deluje neposredno na MTT (npr. snov, ki neposredno zmanjša MTT), je običajne barve ali se obarva med tretiranjem tkiva, je treba izvesti dodatne kontrole, da se zaznajo in odpravijo interference preskusne kemikalije s tehniko za merjenje viabilnosti (glej odstavka 29 in 33). Za podrobnejši opis načina glede popravka neposrednega zmanjšanja MTT in vpliva barvil glej standardne operativne postopke za štiri validirane modele, vključene v to preskusno metodo (32) (33) (34) (35).
29. Za opredelitev snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, je treba vsako preskusno kemikalijo dodati v sveže pripravljeno raztopino MTT. Če se zmes MTT, ki vsebuje preskusno kemikalijo, obarva modro/vijolično, se šteje, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT, zato je treba izvesti dodatno funkcionalno preverjanje na neviabilnih tkivih rekonstruirane človeške pokožnice, in to neodvisno od uporabe meritve standardne absorbance (OD) ali postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC. Pri tem dodatnem funkcionalnem preverjanju se uporabijo odmrla tkiva, ki imajo samo rezidualno presnovno aktivnost, vendar preskusno kemikalijo absorbirajo podobno kot viabilna tkiva. Vsaka preskusna kemikalija, ki zmanjšuje MTT, se nanese na vsaj dva ponovljena vzorca odmrlega tkiva, na katerih se nato opravi celotni postopek preskušanja, da pride do nespecifične redukcije MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Za vsako preskusno kemikalijo zadostuje ena sama kontrola NSMTT, ne glede na število izvedenih samostojnih preskusov/ponovitev. Dejanska viabilnost tkiva se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi snovi, ki zmanjšuje MTT, od katerega se odšteje delež nespecifične redukcije MTT, dobljen z odmrlimi tkivi, izpostavljenimi isti snovi, ki zmanjšuje MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja (% NSMTT).
30. Za opredelitev morebitnega vplivanja obarvanih preskusnih kemikalij ali preskusnih kemikalij, ki so se obarvale v stiku z vodo ali izopropanolom, in odločitev, ali so potrebne dodatne kontrole, je treba opraviti spektralno analizo preskusne kemikalije v vodi (okolje med izpostavljenostjo) in/ali izopropanolu (raztopina za ekstrakcijo). Če preskusna kemikalija v vodi in/ali izopropanolu absorbira svetlobo v razponu 570 ± 30 nm, je treba izvesti dodatne kontrole z barvilom ali pa uporabiti postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC, pri čemer v tem primeru te kontrole niso potrebne (glej odstavka 33 in 34). Pri izvajanju meritve standardne absorbance (OD) se vsaka moteča obarvana preskusna kemikalija nanese na vsaj dva ponovljena vzorca viabilnega tkiva, na katerih se izvede celotni postopek preskušanja, vendar se v fazi inkubacije MTT inkubirata z gojiščem namesto z raztopino MTT, da se dobi kontrola z nespecifično barvo (NSC_{živo}). Kontrolo z nespecifično barvo (NSC_{živo}) je treba izvesti sočasno s preskušanjem obarvane preskusne kemikalije, v primeru večkratnega preskušanja pa je treba zaradi inherentne biološke variabilnosti živih tkiv za vsak izvedeni preskus (pri vsaki ponovitvi) izvesti neodvisno kontrolo z nespecifično barvo (NSC_{živo}). Dejanska viabilnost tkiv se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiv, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z raztopino MTT, od katerega se odšteje delež nespecifične barve, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z gojiščem brez MTT, pri čemer je bil ta preskus izveden sočasno s preskusom, ki se popravlja (% NSC_{živo}).
31. Pri preskusnih kemikalijah, za katere je ugotovljeno, da neposredno zmanjšujejo MTT (glej odstavek 29) in povzročajo barvno interferenco (glej odstavek 30), je potreben tudi tretji niz kontrol poleg NSMTT in NSC_{živo}, opisanih v prejšnjih odstavkih, ko se izvaja meritev standardne absorbance (OD). To po navadi velja za temno obarvane preskusne kemikalije, ki motijo analizo MTT (npr. modre, vijoličaste, črne), ker njihova lastna barva ovira presojo njihove zmožnosti za neposredno redukcijo MTT, kot je opisana v odstavku 29. Te preskusne kemikalije se lahko vežejo na živa in odmrta tkiva, zato se s kontrolo NSMTT ne le popravi potencialna neposredna redukcija MTT zaradi preskusne kemikalije, ampak tudi barvna interferenca, ki nastane zaradi vezave preskusne kemikalije na odmrta tkiva. To bi lahko vodilo do dvojnega popravka barvne interference, saj se s kontrolo NSC_{živo} že popravi barvna interferenca, ki jo povzroča vezava preskusne kemikalije na živa tkiva.

Za preprečitev morebitnega dvojnega popravka barvne interference je treba izvesti še tretjo kontrolo za nespecifično barvo v odmrlih tkivih (NSC_{odmrlo}). Pri tej dodatni kontroli se preskusna kemikalija nanese na vsaj dva ponovljena vzorca odmrlega tkiva, na katerih se izvede celoten postopek preskušanja, vendar se v fazi inkubacije MTT inkubirata z gojiščem namesto z raztopino MTT. Za vsako preskusno kemikalijo zadostuje ena sama kontrola NSC_{odmrlo} ne glede na število izvedenih neodvisnih preskusov/ponovitev, vendar jo je treba izvesti sočasno s kontrolo NSMTT in po možnosti z isto serijo tkiva. Dejanska viabilnost tkiva se nato izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, od katerega se odštejeta % NSMTT in % $NSC_{živo}$, prišteje pa se mu delež nespecifične barve, dobljen z odmrli tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z medijem brez MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja (% NSC_{odmrlo}).

32. Pomembno je poudariti, da se lahko zaradi nespecifične redukcije MTT in nespecifičnih barvnih interferenc povečajo odčitki izvlečka tkiva nad razponom linearnosti spektrofotometra. Na tej podlagi mora vsak laboratorij najprej določiti razpon linearnosti svojega spektrofotometra s formazanom MTT (št. CAS 57360-69-7) iz komercialnega vira, šele nato lahko začne preskušanje preskusnih kemikalij za regulativne namene. Meritev standardne absorbanse (OD) z uporabo spektrofotometra je ustrezna za oceno snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in preskusnih kemikalij, ki povzročajo barvno interferenco, ko so optične gostote izvlečkov tkiv, dobljene s preskusno kemikalijo brez kakršnega koli popravka za neposredno redukcijo MTT in/ali barvno interferenco, znotraj linearne razpona spektrofotometra ali ko nepopravljeni delež viabilnosti, dobljen s preskusno kemikalijo, že znaša $\leq 50\%$. Vendar je treba rezultate za preskusne kemikalije, ki povzročajo % NSMTT in/ali % $NSC_{živo} \geq 50\%$ negativne kontrole, obravnavati previdno, saj je to mejna vrednost, ki se uporablja za razlikovanje med razvrščenimi in nerazvrščenimi kemikalijami (glej odstavek 36).
33. Za obarvane preskusne kemikalije, ki niso združljive z meritvijo standardne absorbanse (OD) zaradi premočnega vplivanja na analizo MTT, se lahko uporabi alternativni postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC za merjenje formazana MTT (glej odstavek 34) (36). Sistem spektrofotometrije HPLC/UPLC omogoča, da se formazan MTT loči od preskusne kemikalije pred njegovo kvantifikacijo (36). Iz tega razloga kontrole $NSC_{živo}$ ali NSC_{odmrlo} pri uporabi spektrofotometrije HPLC/UPLC niso nikoli potrebne, in to ne glede na to, katera kemikalija se preskuša. Kljub temu je treba kontrole NSMTT uporabiti v primeru suma, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT ali da njena barva ovira oceno sposobnosti za neposredno redukcijo MTT (kot je opisano v odstavku 29). Kadar se za merjenje formazana MTT uporabi spektrofotometrija HPLC/UPLC, se delež viabilnosti tkiva izračuna kot razmerje med površino vrha formazana MTT, dobljeno z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, in površino vrha formazana MTT, dobljeno s sočasno negativno kontrolo. Za preskusne kemikalije, ki lahko neposredno zmanjšajo MTT, se dejanska viabilnost tkiva izračuna kot delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, od katerega se odšteje % NSMTT. Nazadnje, opozoriti je treba, da snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT in lahko povzročijo tudi barvno interferenco ter ki ostanejo v tkivih po tretiranju in zmanjšujejo MTT tako močno, da optične gostote (z uporabo standardne meritve optične gostote) ali površine vrha (z uporabo spektrofotometrije UPLC/HPLC) preskušanih izvlečkov tkiv, ki presegajo razpon linearnosti spektrofotometra, ni mogoče oceniti, čeprav naj bi se to zgodilo samo v zelo redkih primerih.
34. Spektrofotometrija HPLC/UPLC se lahko uporabi tudi z vsemi vrstami preskusnih kemikalij (obarvanimi, neobarvanimi, kemikalijami, ki zmanjšujejo MTT, in tistimi, ki ne zmanjšujejo MTT) za merjenje formazana MTT (36). Zaradi raznovrstnosti sistemov spektrofotometrije HPLC/UPLC je treba usposobljenost sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC dokazati pred njegovo uporabo za kvantifikacijo formazana MTT iz izvlečkov tkiv, tako da izpolnjuje merila za sprejemljivost za niz standardnih parametrov ustreznosti na podlagi tistih, ki so opisani v smernicah ameriške uprave za hrano in zdravila za industrijo v zvezi z bioanalitično metodo validacije (36) (37). Ti ključni parametri in njihova merila za sprejemljivost so prikazani v Dodatku 4. Ko so izpolnjena merila za sprejemljivost, opredeljena v Dodatku 4, se sistem spektrofotometrije HPLC/UPLC šteje za ustrezen in je pripravljen za merjenje formazana MTT v poskusnih pogojih, opisanih v tej preskusni metodi.

Merila za sprejemljivost

35. Za vsako preskusno metodo, pri kateri se uporabljajo ustrezne serije modelov rekonstruirane človeške pokožnice (glej odstavek 23), morajo imeti tkiva, tretirana z negativno kontrolo, optično gostoto, iz katere je razvidna kakovost tkiv, pri katerih so se upoštevale zahtevane stopnje in vsi postopki protokola. Vrednosti kontrol optične gostote ne smejo biti nižje od v preteklosti postavljenih mej. Podobno mora biti iz tkiv, tretiranih s pozitivno kontrolo, tj. 5-odstotnim vodnim SDS, razvidna sposobnost, da se odzovejo na jedko kemikalijo v pogojih preskusne metode (glej Dodatek 3 in za več informacij standardne operative postopke štirih preskusnih modelov, vključenih v to smernico za preskušanje (32) (33) (34) (35)). S tem povezane ustrezne meritve variabilnosti med ponovljenimi vzorci tkiv, tj. standardni odkloni, morajo biti znotraj meja sprejemljivosti, določenih za uporabljeni preskusni model (glej Dodatek 3).

Razlaga rezultatov in napovedni model

36. Vrednosti optične gostote, pridobljene z vsako preskusno kemikalijo, se lahko uporabijo za izračun deleža viabilnosti, normaliziranega na negativno kontrolo, katere viabilnost znaša 100 %. Če se uporabi spektrofotometrija HPLC/UPLC, se delež viabilnosti tkiva izračuna kot delež površine vrha formazana MTT, dobljene z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, glede na vrh formazana MTT, dobljen s sočasno negativno kontrolo. Mejna vrednost deleža viabilnosti celic, ki dražilne preskusne kemikalije loči od nerazvrščenih, in statistični postopki, ki se uporabljajo za ocenjevanje rezultatov ter določanje dražilnih kemikalij, morajo biti natančno opredeljeni in evidentirani ter dokazani kot ustrezni (za več informacij glej standardne operativne postopke preskusnih modelov). Mejne vrednosti za napoved draženja so podane v nadaljevanju.

- Za preskusno kemikalijo se šteje, da jo je treba razvrstiti in označiti v skladu z GHS ZN/uredbo CLP (kategorija 2 ali kategorija 1), če je povprečni delež viabilnosti tkiva po izpostavljenosti in inkubaciji po tretiranju manjši ali enak ($\leq$) 50 %. Ker s preskusnimi modeli rekonstruirane človeške pokožnice, ki so zajeti s to preskusno metodo, ni mogoče razlikovati med kategorijama 1 in 2 po GHS ZN/uredbi CLP, je za končno razvrstitev preskusne kemikalije potrebnih več informacij o jedkosti za kožo (glej tudi smernico OECD za preskušanje v zvezi z IATA (3)). Če se za preskusno kemikalijo ugotovi, da ni jedka (npr. na podlagi preskusne metode B40, B.40a ali B.65), in je viabilnost tkiva po izpostavljenosti in inkubaciji po tretiranju manjša ali enaka ($\leq$) 50 %, se za preskusno kemikalijo šteje, da je jedka za kožo v skladu s kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP.
- Odvisno od regulativnega okvira v državah članicah se lahko za preskusno kemikalijo šteje, da ni jedka za kožo, tj. 'brez kategorije' po GHS ZN/uredbi CLP, če je viabilnost tkiva po izpostavljenosti in inkubaciji po tretiranju večja kot ($>$) 50 %.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

37. Za vsako ponovitev je treba podatke o posameznih ponovljenih vzorcih tkiv (npr. vrednosti optične gostote in podatke o izračunanem deležu viabilnih celic za vsako preskusno kemikalijo, vključno z razvrščanjem) navesti v obliki preglednice, po potrebi vključno s podatki iz ponovljenih poskusov. To pomeni, da je treba za vsako ponovitev navesti srednje vrednosti $\pm$ standardni odklon. Za vsako preskusno kemikalijo je treba navesti opažene interakcije med reagentom MTT in obarvanimi preskusnimi kemikalijami.

Poročilo o preskusu

38. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija in kontrolne kemikalije:

- Snov iz ene sestavine kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.
- Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi: čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin;
- fizični videz, topnost v vodi in morebitne dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;
- vir, številka serije, če je na voljo;
- obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);
- stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan;
- pogoji skladiščenja.

Uporabljen model in protokol rekonstruirane človeške pokožnice (ter utemeljitev izbire, če je ustrezno).

Preskusni pogoji:

- uporabljeni model rekonstruirane človeške pokožnice (vključno s številko serije);
- podatki o umerjanju za merilno napravo (npr. spektrofotometer), valovna dolžina in filtrirana valovna dolžina (če je ustrezno), ki se uporabljajo za kvantifikacijo formazana MTT, ter razpon linearnosti merilne naprave; opis metode, uporabljene za kvantifikacijo formazana MTT;
- opis ustreznosti sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC, če je ustrezno; popolne informacije v podporo specifičnemu uporabljenemu modelu rekonstruirane človeške pokožnice, vključno z njegovo učinkovitostjo. To mora med drugim vključevati:
 - (i) viabilnost;
 - (ii) pregradno funkcijo;
 - (iii) morfologijo;
 - (iv) obnovljivost in napovedljivost;
 - (v) kontrole kakovosti modela;
- navedba podatkov o modelu iz preteklih preskusov. To mora med drugim vključevati sprejemljivost podatkov o kontroli kakovosti s sklicevanjem na podatke o seriji, pridobljene v preteklosti.
- dokaz o usposobljenosti za izvajanje preskusne metode pred redno uporabo s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti.

Preskusni postopek:

- podrobnosti o uporabljenem preskusnem postopku (vključno s postopki spiranja, ki se uporabijo po obdobju izpostavljenosti); odmerki uporabljene preskusne kemikalije in kontrolnih kemikalij;
- trajanje in temperatura izpostavljenosti in obdobja inkubacije po izpostavljenosti;
- navedba kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšajo MTT, in/ali barvilnih preskusnih kemikalij, če je ustrezno;
- število ponovljenih vzorcev tkiv, uporabljenih za vsako preskusno kemikalijo in kontrole (pozitivna kontrola, negativna kontrola in NSMTT, $NSC_{\text{živo}}$ in NSC_{odmrlo} , če je ustrezno);
- opis uporabljenih meril za odločanje/napovednega modela na podlagi uporabljenega modela rekonstruirane človeške pokožnice;
- opis morebitnih prilagoditev preskusnega postopka (vključno s postopki spiranja).

Merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa:

- srednje vrednosti pozitivne in negativne kontrole ter razponi sprejemljivosti na podlagi podatkov iz preteklih preskusov; sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za pozitivne in negativne kontrole;
- sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za preskusno kemikalijo.

Rezultati:

- preglednice s podatki o posamezni preskusni kemikaliji za vsako ponovitev in vsako ponovljeno meritev, vključno z optično gostoto ali površino vrha formazana MTT, deležem viabilnosti tkiv, povprečnim deležem viabilnosti tkiv in standardnim odklonom;
- če je ustrezno, rezultati kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in/ali barvilne preskusne kemikalije, vključno z optično gostoto ali površino vrha formazana MTT, % NSMTT, % NSC_{živo}, % NSC_{odmrlo}, standardnim odklonom, končnim pravilnim deležem viabilnosti tkiv;
- rezultati, dobjeni s preskusnimi kemikalijami in kontrolami glede na opredeljena merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa;
- opis drugih opaženih učinkov;
- izpeljana razvrstitev z navedbo uporabljenega napovednega modela/meril za odločitev.

Razprava o rezultatih**Sklepne ugotovitve****VIRI**

- (1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), druga revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva, 2013. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the 'Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards', izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9. april 2009. Na voljo na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf
- (3) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 203), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (4) Poglavje B.4 te priloge, Akutno draženje kože, jedkost za kožo.
- (5) Poglavje B.40 te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: transkutana električna upornost (TER).
- (6) Poglavje B.40bis te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: preskusna metoda rekonstruirane človeške pokožnice.
- (7) Poglavje B.65 te priloge, Preskusna metoda membranske pregrade *in vitro*.
- (8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 220). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

- (10) Fentem, J. H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G. R., Harbell, J. W., Heylings, J. R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J. J. M., in 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., in 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., in 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., in 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., in Rubinstein, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329–349.
- (15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P. A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R. D., Elliot, G. R., Fentem, J. H., Heylings, J. R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J. J. M., Wiemann, C., in Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109–129.
- (16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I., in Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559–601.
- (17) Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α .
- (18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I., in 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., in Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351–358.
- (20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27. april 2007. Na voljo na: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf
- (21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. Opomba: to so prvotni standardi izvajanja za validacijo dveh preskusnih metod. Ti standardi izvajanja se ne smejo več uporabljati, ker je zdaj na voljo posodobljena različica (8).
- (22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5. november 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-081201.pdf

- (23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment (št. 137), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T., in Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol Sci*, 34, 327–334.
- (25) Katoh, M., in Hata, K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111–122.
- (26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 159), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 155), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y., in Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33–50.
- (29) Welss, T., Basketter, D. A., in Schröder, K. R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231–243.
- (30) Eskes, C., *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393–403.
- (31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- (32) EpiSkin™ (februar 2009). SOP, Version 1.8 ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals
- (33) EpiDerm™ (revidirano marca 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).
- (34) SkinEthic™ RHE (februar 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.
- (35) LabCyte (junij 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model 'LabCyte EPI-MODEL24'.
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K. R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., in McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Rokopis v pripravi.
- (37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Maj 2001. Na voljo na: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].

- (38) Harvell, J. D., Lamminstausta, K., in Maibach, H. I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, v: Practical Contact Dermatitis, str. 7–18, (ur. Guin, J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- (39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Opomba: to je trenutna različica standardov izvajanja ECVAM, posodobljena leta 2009 zaradi izvajanja GHS ZN. Ti standardi izvajanja se ne smejo več uporabljati, ker je zdaj na voljo posodobljena različica (8), povezana s to smernico za preskušanje.*
- (40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, izdal ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8. julij 2009.
- (41) ES (2001). Direktiva Komisije 2001/59/ES z dne 6. avgusta 2001 o 28. prilagoditvi tehničnemu napredku Direktive Sveta 67/548/EGS o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih snovi, Uradni list Evropske unije, L 225, str. 1–333.

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (9).

Viabilnost celic: parameter za merjenje celotne dejavnosti celične populacije, npr. zmožnosti celičnih mitohondrijskih dehidrogenaz za redukcijo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, tiazolil modro), ki se glede na izmerjeno končno točko in uporabljeni načrt preskusa ujema s skupnim številom in/ali vitalnostjo živih celic.

Kemikalija: pomeni snov ali zmes.

Skladnost: je merilo učinkovitosti za preskusne modele, s katerimi se pridobijo kategorični rezultati, in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz točnost se včasih uporabljata kot sopomenki in pomenita delež vseh preskušanih kemikalij, ki so pravilno razvrščene kot pozitivne ali negativne. Skladnost je zelo odvisna od razširjenosti pozitivnih rezultatov v vrstah preučevane preskusne kemikalije (9).

ET₅₀: lahko se oceni z določanjem časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti celic za 50 % po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne kemikalije, glej tudi IC₅₀.

GHS (globalno usklajeni sistem Združenih narodov (ZN) za razvrščanje in označevanje kemikalij): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography).

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment (celostni pristop k testiranju in ocenjevanju).

IC₅₀: lahko se oceni z določanjem koncentracije, pri kateri primerjalna kemikalija po določenem času izpostavljenosti zmanjša viabilnost tkiv za 50 % (IC₅₀), glej tudi ET₅₀.

Prevelik odmerek: količina na pokožnico nanese preskusne kemikalije, ki je večja od količine, potrebne za celotno in enakomerno prekritje površine pokožnice.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

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

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

NSC_{odmrlo}: nespecifična barva v odmrlih tkivih.

NSC_{zivo}: nespecifična barva v živih tkivih.

NSMTT: nespecifična redukcija MTT.

Standardi izvajanja (SI): standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi in so podlaga za oceno primerljivosti predlagane preskusne metode, ki je funkcijsko in mehanistično podobna. Vključujejo: (i) nujne elemente preskusne metode; (ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (iii) primerljive stopnje točnosti in zanesljivosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, kar mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (9).

PC: pozitivna kontrola, ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s kemikalijo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere se s preskusom pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (9).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih (9).

Nadomestni preskus: preskus, ki nadomesti preskus, ki se redno uporablja in je uveljavljen za ugotavljanje nevarnosti in/ali oceno tveganja ter za katerega je bilo ugotovljeno, da v primerjavi z uveljavljenim preskusom v vseh mogočih okoliščinah preskušanja in za vse mogoče preskusne kemikalije zagotavlja enakovredno ali izboljšano varstvo zdravja ljudi ali živali ali okolja, kot je ustrezno (9).

Ponovitev: ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušanih sočasno z negativno kontrolo in pozitivno kontrolo.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (9).

Draženje kože *in vivo*: je nastanek povračljive poškodbe kože po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure. Razdraženost kože je lokalna reakcija prizadetega kožnega tkiva, ki se pojavi kmalu po izpostavitvi kože draženju (38). Povzroči jo lokalna vnetna reakcija, v katero je vključen prirojeni (nespecifični) imunski sistem kožnega tkiva. Njena glavna lastnost je povračljiv proces, ki vključuje vnetne reakcije in večino značilnih kliničnih znakov razdraženosti (rdečino, oteklino, srbenje in bolečino), povezanih z vnetnim procesom.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (9).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te preskusne metode.

UPLC: tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (Ultra-High Performance Liquid Chromatography).

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

Dodatek 2

PRESKUSNI MODELI, VKLJUČENI V TO PRESKUSNO METODO

Št.	Ime preskusnega modela	Vrsta validacijske študije	Viri
1	EpiSkin™	Celovita prospektivna validacijska študija (2003–2007). Elementi tega modela so bili uporabljeni za opredelitev bistvenih elementov preskusne metode prvotnih in posodobljenih standardov izvajanja ECVAM (39) (40) (21) (*). Poleg tega so bili podatki o metodi, ki se nanašajo na razlikovanje med nerazvrščenimi in razvrščenimi snovmi, glavna podlaga za opredelitev vrednosti specifičnosti in občutljivosti prvotnih standardov izvajanja (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (prvotni): preskusni model je bil najprej predmet celovite prospektivne validacije skupaj s št. 1. iz obdobja 2003–2007. Elementi tega modela so bili uporabljeni za opredelitev bistvenih elementov preskusnih metod prvotnih in posodobljenih standardov izvajanja ECVAM (39) (40) (21) (*). EpiDerm™ SIT (EPI-200): prilagoditev prvotnega modela EpiDerm™ je bila validirana z uporabo prvotnih standardov izvajanja ECVAM (21) v letu 2008 (*). (2) (21) (22) (23) (33)	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40)
3	SkinEthic™ RHE	Validacijska študija na podlagi prvotnih standardov izvajanja ECVAM (21) v letu 2008 (*).	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validacijska študija (2011–2012) na podlagi standardov izvajanja iz Smernice OECD za preskušanje 439 (8), ki temeljijo na posodobljenih standardih izvajanja ECVAM (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) in standardi izvajanja te smernice za preskušanje (8) (*)

(*) Prvotni standardi izvajanja ECVAM (21) so bili pripravljeni leta 2007 po koncu prospektivne validacijske študije (16), s katero se je ocenila učinkovitost preskusnih modelov št. 1 in 2 glede na sistem razvrščanja, opisan v 28. spremembi direktive EU o nevarnih snoveh (41). Leta 2008 sta bila uvedena GHS ZN (1) in uredba CLP, s katerima se je mejna vrednost za razlikovanje med nerazvrščenimi in razvrščenimi snovmi na podlagi rezultata *in vivo* dejansko dvignila z 2,0 na 2,3. Zaradi prilagoditve tej spremenjeni regulativni zahtevi so bili v letu 2009 posodobljeni vrednosti točnosti in seznam referenčnih kemikalij iz standardov izvajanja ECVAM (2) (39) (40). Tako kot prvotni standardi izvajanja so tudi posodobljeni standardi izvajanja večinoma temeljili na podatkih iz modelov št. 1 in 2 (16), vendar so se dodatno uporabili tudi podatki o referenčnih kemikalijah iz modela št. 3. Leta 2010 so bili posodobljeni standardi izvajanja ECVAM uporabljeni za določitev standardov izvajanja, povezanih s temi smernicami za preskušanje (8). Za namen te preskusne metode se model EpiSkin™ šteje za VRM, ker je bil uporabljen za pripravo vseh meril standardov izvajanja. Podrobne informacije o validacijskih študijah, zbirka pridobljenih podatkov in ozadje nujnih prilagoditev standardov izvajanja zaradi izvajanja GHS ZN/uredbe CLP so na voljo v obrazložitem referenčnem dokumentu ECVAM/BfR k ustreznim smernicam OECD za preskušanje 439 (23).

SIT: preskus draženja kože.

RHE: rekonstruirana človeška pokožnica.

Dodatek 3

PARAMETRI PROTOKOLA, SPECIFIČNI ZA VSAKEGA OD PRESKUSNIH MODELOV, VKLJUČENIH V TO PRESKUSNO METODO

Modeli rekonstruirane človeške pokožnice (RhE) dejansko prikazujejo zelo podobne protokole, zlasti vsi uporabljajo 42-urno obdobje po inkubaciji (32) (33) (34) (35). Razlike se nanašajo predvsem na tri parametre v zvezi z različnimi pregradnimi funkcijami preskusnih modelov, in sicer: (A) čas predhodne inkubacije in količina, (B) nanos preskusnih kemikalij in (C) količina po inkubaciji.

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

(A) Predhodna inkubacija

Čas inkubacije	18–24 ur	18–24 ur	< 2 uri	15–30 ur
Količina medija	2 ml	0,9 ml	0,3 ali 1 ml	0,5 ml

(B) Nanos preskusne kemikalije

Za tekočine	10 µl (26 µl/cm ²)	30 µl (47 µl/cm ²)	16 µl (32 µl/cm ²)	25 µl (83 µl/cm ²)
Za trdne snovi	10 mg (26 mg/cm ²) + DV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm ²) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm ²) + DV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm ²) + DV (25 µl)
Uporaba najlonske mrežice	se ne uporablja	po potrebi	uporabljena	se ne uporablja
Skupni čas nanosa	15 minut	60 minut	42 minut	15 minut
Temperatura ob nanosu	ST	(a) 25 minut pri ST (b) 35 minut pri 37 °C	ST	ST

(C) Količina po inkubaciji

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

(D) Največja sprejemljiva razlika

Standardni odklon med ponovljenimi vzorci tkiv	SO18	SO18	SO18	SO18
--	------	------	------	------

ST: sobna temperatura.

DV: destilirana voda.

DPBS: Dulbeccov fosfatni pufer s soljo.

Dodatek 4

KLJUČNI PARAMETRI IN MERILA ZA SPREJEMLJIVOST ZA USTREZNOST SISTEMA SPEKTROFOTOMETRIJE HPLC/UPLC ZA MERJENJE FORMAZANA MTT, EKSTRAHIRANEGA IZ TKIV REKONSTRUIRANE ČLOVEŠKE POKOŽNICE (RHE)

Parameter	Protokol, izpeljan iz smernic FDA (36) (37)	Merila za sprejemljivost
Selektivnost	Analiza izopropanola, živega slepega vzorca (izvleček izopropanola iz živih tkiv rekonstruirane človeške pokožnice brez kakršnega koli tretiranja), odmrlega slepega vzorca (izvleček izopropanola iz odmrlih tkiv rekonstruirane človeške pokožnice brez kakršnega koli tretiranja).	$Površina_{interferenca} \leq 20 \% površine_{LLOQ}^{(1)}$.
Natančnost	kontrole kakovosti (tj. formazan MTT pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml in 160 µg/ml) v izopropanolu (n = 5).	$KV \leq 15 \% \text{ ali } \leq 20 \% \text{ za LLOQ.}$
Točnost	Kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	$\% Dev \leq 15 \% \text{ ali } \leq 20 \% \text{ za LLOQ.}$
Vpliv matriksa	Kontrole kakovosti v živem slepem vzorcu (n = 5).	$85 \% \leq \text{vpliv matriksa } \% \leq 115 \%$.
Prenos	Analiza izopropanola po standardu ULOQ ⁽²⁾ .	$Površina_{interferenca} \leq 20 \% površine_{LLOQ}$.
Obnovljivost (znotraj dneva)	3 neodvisne umeritvene krivulje (na podlagi 6 zaporednih tretjinskih razredčin formazana MTT v izopropanolu, ki se začnejo pri ULOQ, tj. 200 µg/ml); kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	Umeritvene krivulje: $\% Dev \leq 15 \% \text{ ali } \leq 20 \% \text{ za LLOQ.}$
Obnovljivost (med dnevi)	1. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 2. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 3. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3).	Kontrole kakovosti: $\% Dev \leq 15 \% \text{ in } KV \leq 15 \%$.
Kratkoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruirane človeške pokožnice	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po 24 urah hrambe pri sobni temperaturi.	$\% Dev \leq 15 \%$.
Dolgoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruirane človeške pokožnice, če je potrebno	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po več dneh hrambe pri določeni temperaturi (npr. 4 °C, -20 °C, -80 °C).	$\% Dev \leq 15 \%$.

(¹) LLOQ: spodnja meja kvantifikacije (Lower Limit of Quantification), opredeljena tako, da zajema 1–2-odstotno viabilnost tkiva, tj. 0,8 µg/ml.

(²) ULOQ: zgornja meja kvantifikacije (Upper Limit of Quantification), opredeljena tako, da je vsaj dvakrat višja od najvišje pričakovane koncentracije formazana MTT v izvlečkih izopropanola iz negativnih kontrol, tj. 200 µg/ml.

(8) V delu B se dodajo naslednja poglavja:

„B.63 PRESEJALNI PRESKUS TOKSIČNOSTI ZA RAZMNOŽEVANJE/RAZVOJ

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 421 (2016). Smernice OECD za preskušanje kemikalij se redno pregledujejo ob upoštevanju znanstvenega napredka. Prvotna smernica za presejalni preskus 421 je bila sprejeta leta 1995 na podlagi protokola za ‚predhodni presejalni preskus toksičnosti za razmnoževanje‘, o katerem se je razpravljalo na dveh strokovnih srečanjih, in sicer leta 1990 v Londonu (1) in leta 1992 v Tokiu (2).
2. Ta preskusna metoda je bila posodobljena z ustreznimi končnimi točkami za endokrine motilce kot nadaljnji ukrep v okviru prednostne dejavnosti, ki jo je OECD začela izvajati leta 1998, da bi pregledala obstoječe smernice za preskušanje ter pripravila nove smernice za presejalne preskuse in preskušanje potencialnih endokrinih motilcev (3). Smernica OECD za preskušanje 407 (28-dnevna študija oralne toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki na glodavcih, poglavje B.7 te priloge) je bila na primer leta 2008 izboljšana s parametri, primernimi za zaznavanje endokrinega delovanja preskusnih kemikalij. Namen posodobitve Smernice za preskušanje 421 je bil, da se v smernice za presejalno preskušanje vključijo nekatere ustrezne končne točke za endokrine motilce, kadar obdobja izpostavljenosti zajemajo nekatera občutljiva obdobja med razvojem (pred rojstvom ali malo po rojstvu).
3. Izbrane dodatne ustrezne končne točke za endokrine motilce, ki so tudi del Smernice za preskušanje 443 (razširjene študije toksičnosti za razmnoževanje na eni generaciji, poglavje B.56 te priloge), so bile v Smernico za preskušanje 421 vključene na podlagi študije izvedljivosti, s katero so se obravnavala znanstvena in tehnična vprašanja, povezana z njihovo vključitvijo, ter morebitne prilagoditve načrta preskusa, potrebne za njihovo vključitev (4).
4. Ta preskusna metoda naj bi zagotovila omejene informacije v zvezi z učinki preskusne kemikalije na sposobnost razmnoževanja pri samcih in samicah, kot so funkcija spolnih žlez, obnašanje pri parjenju, spočetje, razvoj zarodka in kotitev. Ni alternativa obstoječim preskusnim metodam B.31, B.34, B.35 ali B.56 niti jih ne nadomešča.

ZAČETNI PREUDARKI

5. Ta metoda presejalnega preskusa se lahko uporablja za zagotovitev začetnih informacij o morebitnih učinkih na razmnoževanje in/ali razvoj bodisi v zgodnji fazi ocenjevanja toksikoloških lastnosti kemikalij bodisi v zvezi s kemikalijami, ki vzbujajo zaskrbljenost. Uporabi se lahko tudi v okviru sklopa začetnih presejalnih preskusov za obstoječe kemikalije, za katere je na voljo malo ali nič toksikoloških informacij, kot študija za določanje območja odmerka za obsežnejše razmnoževalne/razvojne študije ali če se zdi pomembna kako drugače. Pri izvajanju študije je treba upoštevati vodilna načela in preudarke iz Smernice OECD 19 o prepoznavanju, oceni in uporabi kliničnih znakov kot humanih končnih točk za preskusne živali, ki se uporabljajo pri ocenah varnosti (5).
6. Ta preskusna metoda ne zagotavlja popolnih informacij o vseh vidikih razmnoževanja in razvoja. Zlasti zagotavlja samo omejene načine, kako po rojstvu zaznavati pojavne oblike izpostavljenosti pred rojstvom ali učinke, ki jih lahko povzroči izpostavljenost po rojstvu. Zaradi (med drugim) razmeroma majhnega števila živali v skupinah, ki prejemajo odmerke, selektivnosti končnih točk in kratkotrajnosti študije ta metoda ne zagotavlja dokazov za dokončne trditve o neobstoju učinkov. Če ni podatkov iz drugih preskusov toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, so poleg tega pozitivni rezultati koristni za začetno oceno nevarnosti in prispevajo k odločitvam v zvezi z nujnostjo in časovnim okvirom dodatnega preskušanja.
7. Rezultate, ki se dobijo s parametri, povezanimi z endokrinim sistemom, je treba obravnavati v okviru temeljnega okvira OECD za preskušanje in ocenjevanje kemikalij, ki povzročajo endokrine motnje (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) (6). V tem temeljnem okviru je izboljšana Smernica OECD za preskušanje 421 vključena na ravni 4 kot preskus *in vivo*, ki zagotavlja podatke o škodljivih učinkih na ustrezne končne točke za endokrini sistem. Vendar zgolj endokrinega signala ni mogoče šteti za zadosten dokaz, da je preskusna kemikalija endokrini motilec.
8. Pri tej preskusni metodi je predvideno oralno dajanje preskusne kemikalije. Če se uporabijo drugi načini izpostavljenosti, so morda potrebne prilagoditve.

9. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.
10. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

NACELO PRESKUSA

11. Preskusna kemikalija se daje v stopnjevanih odmerkih več skupinam samcev in samic. Samcem je treba dajati odmerke najmanj štiri tedne in do vključno dneva pred predvideno usmrtnitvijo (to vključuje vsaj dva tedna pred parjenjem, obdobje parjenja in približno dva tedna po parjenju). Glede na omejeno obdobje odmerjanja pred parjenjem pri samcih plodnost morda ni posebno občutljiv kazalnik toksičnosti za moda. Zato je bistven podroben histološki pregled mod. Kombinacija dvotedenskega obdobja odmerjanja pred parjenjem in poznejših opazovanj parjenja/plodnosti s skupno vsaj štiritedenskim obdobjem odmerjanja, ki mu sledi podroben histopatološki pregled spolnih žlez samcev, se šteje za zadostno, da se lahko zazna večina učinkov na plodnost pri samcih in spermatogenezo.
12. Samicam je treba dajati odmerke med celotno študijo. To vključuje dva tedna pred parjenjem (da se zajameta vsaj dva popolna pojavna cikla), različen čas do spočetja, trajanje brejosti in vsaj 13 dni po kotitvi, do vključno dneva pred predvideno usmrtnitvijo.
13. Trajanje študije (po aklimatizaciji in oceni pojavnega cikla pred odmerjanjem) je odvisno od delovanja samice in traja približno 63 dni (vsaj 14 dni pred parjenjem, (do) 14 dni parjenja, 22 dni brejosti, 13 dni laktacije).
14. V obdobju dajanja odmerkov je treba živali vsak dan pozorno opazovati, ali kažejo znake zastrupitve. Na živalih, ki med preskusnim obdobjem poginejo ali so usmrčene, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa se tudi preživele živali usmrtijo in obducirajo.

OPIS METODE

Izbira živalskih vrst

15. Pri tej preskusni metodi naj bi se uporabljale podgane. Če se parametri, določeni pri tej preskusni metodi, preiskujejo na drugi vrsti glodavcev, je treba to podrobno utemeljiti. V mednarodnem validacijskem programu za zaznavanje endokrinih motilcev v Smernicah OECD za preskušanje 407 (ustreza poglavju B.7 te priloge) je bila podgana edina uporabljena vrsta. Sevi z nizko plodnostjo ali dobro znano visoko pojavnostjo razvojnih napak se ne smejo uporabljati. Uporabiti je treba zdrave živali, ki se še niso parile in niso bile izpostavljene predhodnim preskusnim postopkom. Opredeliti je treba vrsto, sev, spol, težo in starost preskusnih živali. Na začetku študije morajo biti razlike v teži uporabljenih živali čim manjše in ne smejo presegati 20 % povprečne teže za vsak spol. Če se študija izvaja kot predhodna študija za dolgotrajno študijo ali študijo celotne generacije, je priporočljivo, da se v obeh študijah uporabijo živali iz istega seva in vira.

Nastanitev in hranjenje

16. Vsi postopki morajo biti v skladu z lokalnimi standardi oskrbe laboratorijskih živali. Temperatura v prostoru s preskusnimi živalmi mora znašati 22 °C (± 3 °). Čeprav mora biti relativna vlažnost vsaj 30-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora, si je treba prizadevati za 50–60-odstotno vlažnost. Osvetlitev mora biti umetna s svetlobnim ciklom 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne primesi preskusne kemikalije, če se daje po tej metodi.

17. Živali morajo biti nastanjene v majhnih skupinah istega spola; posamično so lahko nastanjene, če je to znanstveno utemeljeno. Pri skupinski nastanitvi je lahko v kletki največ pet živali. Parjenje se mora izvajati v kletkah, ki so primerne za ta namen. Breje samice morajo biti v svojih kletkah in imeti na voljo material za izdelavo gnezda. Samice v laktaciji so v svojih kletkah skupaj z mladiči.
18. Hrano je treba redno analizirati, da ne vsebuje kontaminantov. Vzorec hrane je treba hraniti, dokler poročilo ni končano.

Priprava živali

19. Zdrave mlade odrasle živali se naključno dodelijo kontrolnim in tretiranim skupinam. Kletke je treba razporediti tako, da se čim bolj zmanjšajo morebitni učinki, ki nastanejo zaradi razporeditve kletk. Živali se označijo z enkratnimi oznakami in zadržijo v kletkah vsaj pet dni pred začetkom študije, da se prilagodijo na laboratorijske razmere.

Priprava odmerkov

20. Priporoča se, da se preskusna kemikalija daje oralno, razen če se šteje drug način dajanja za primernejšega. Če se izbere oralni način, se preskusna kemikalija običajno daje z gavažo, lahko pa tudi s hrano ali pitno vodo.
21. Po potrebi se preskusna kemikalija raztopi ali suspendira v ustreznem vehiklu. Priporočljivo je, da se, če je mogoče, najprej preuči možnost uporabe vodne raztopine/suspenzije, nato raztopine/emulzije v olju (npr. koruznem), šele potem pa možnost raztopine v drugih vehiklih. V primeru vehiklov, ki niso voda, je treba poznati toksične lastnosti takega vehikla. Določiti je treba stabilnost in homogenost preskusne kemikalije v vehiklu.

POSTOPEK

Število in spol živali

22. Priporočljivo je, da se v vsaki skupini začne z vsaj 10 samci in 12–13 samicami. Pri samicah se pred izpostavitvijo oceni pojavna cikličnost; živali, ki nimajo značilnih 4–5-dnevnih ciklusov, se ne vključijo v študijo; zato se priporočajo dodatne samice za zagotovitev, da je v vsaki skupini 10 samic. Razen v primeru izrazitih toksičnih učinkov naj bi se tako dobilo vsaj 8 brejih samic na skupino, kar je običajno najnižje sprejemljivo število brejih samic na skupino. Cilj je dobiti dovolj brejih samic in mladičev, da je zagotovljeno smiselno ovrednotenje potenciala preskusne kemikalije za vplivanje na plodnost, brejost in materinsko obnašanje ter sesanje, rast in razvoj potomcev F₁ od spočetja do 13. dne po skotitvi.

Odmerjanje

23. Običajno je treba uporabiti najmanj tri preskusne skupine in eno kontrolno skupino. Velikosti odmerkov lahko temeljijo na informacijah iz preskusov akutne toksičnosti ali rezultatih študij s ponavljajočimi se odmerki. Razen tretiranja s preskusno kemikalijo je treba živali v kontrolni skupini obravnavati enako kot živali v preskusni skupini. Če se pri dajanju preskusne kemikalije uporablja vehikel, mora kontrolna skupina prejeti največjo uporabljeno količino vehikla.
24. Pri izbiri velikosti odmerkov je treba upoštevati vse obstoječe podatke o toksičnosti in (toksiko-)kinetiki, ki so na voljo. Upoštevati je treba tudi, da lahko obstajajo razlike v občutljivosti med brejimi in nebrejimi živalmi. Izbrati je treba največjo velikost odmerka, da se povzročijo toksični učinki, ne pa tudi pogin ali hudo trpljenje. Nato je treba izbrati padajoče zaporedje velikosti odmerkov, da se pokažejo vsi odzivi, ki so odvisni od odmerjanja, in ugotovi najmanjša velikost odmerka, pri kateri ni opaženih škodljivih učinkov (NOAEL). Za določanje padajočih velikosti odmerkov je velikokrat najbolje uporabiti dva- do štirikratne intervale, namesto zelo velikih intervalov (npr. večjih od desetkratnika) med odmerjanji pa je pogosto primerneje dodati še četrto preskusno skupino.

25. Če se ugotovijo splošna toksičnost (npr. zmanjšana telesna teža, učinki na jetra, srce, pljuča ali ledvice itd.) ali druge spremembe, ki morda niso toksične reakcije (npr. zmanjšan vnos hrane, povečanje jeter), je potrebna previdnost pri razlagi ugotovljenih učinkov na endokrine občutljive končne točke.

Mejni preskus

26. Če pri oralni študiji pri odmerku, velikem najmanj 1 000 mg/kg telesne teže/dan, ali pri enakovrednem deležu v hrani ali pitni vodi pri vnosu s hrano ali pitno vodo, pri katerem so uporabljeni postopki, opisani za to študijo, ne nastanejo opazni toksični učinki in če na podlagi podatkov o strukturno sorodnih snoveh toksičnost ni pričakovana, popolna študija z več velikostmi odmerkov morda ni potrebna. Mejni preskus se uporabi, razen če izpostavljenost človeka nakazuje potrebo po uporabi večjega oralnega odmerka. Pri drugih načinih dajanja, na primer pri vdihavanju ali dermalni aplikaciji, lahko fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije pogosto določajo največjo dosegljivo koncentracijo.

Dajanje odmerkov

27. Živalim se dajejo odmerki preskusne kemikalije sedem dni na teden. Če se preskusna kemikalija daje z gavažo, jo je treba živali dati v enkratnem odmerku z uporabo želodčne sonde ali primerne intubacijske kanile. Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat, je odvisna od velikosti preskusne živali. Količina ne sme presegati 1 ml/100 g telesne teže, razen v primeru vodnih raztopin, za katere se lahko uporabi 2 ml/100 g telesne teže. Razen pri dražilnih ali jedkih preskusnih kemikalijah, ki pri večjih koncentracijah navadno povzročijo močnejše učinke, je treba s prilagajanjem koncentracije čim bolj zmanjšati spremenljivost preskusne količine, da se zagotovi stalna količina pri vseh velikostih odmerkov.
28. Pri preskusnih kemikalijah, ki se dajejo s hrano ali pitno vodo, je treba zagotoviti, da količine uporabljene preskusne kemikalije ne vplivajo na normalno prehranjevanje ali vodno ravnotežje. Če se preskusna kemikalija daje s hrano, se lahko uporabi konstantna koncentracija v hrani (ppm) ali pa konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali; uporabljeni način je treba navesti. Če se preskusna kemikalija daje z gavažo, je treba odmerke dajati vsak dan ob približno istem času in jih najmanj enkrat tedensko prilagajati, da se vzdržuje konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali.

Načrt za poskus

29. Odmerjanje obema spoloma se mora začeti vsaj 2 tedna pred parjenjem, potem ko so se živali aklimatizirale vsaj pet dni in so bile samice pregledane, ali imajo normalen pojavni ciklus (v dvotedenskem obdobju pred tretiranjem). Študija mora biti načrtovana tako, da se ocenjevanje pojavnega ciklusa začne kmalu potem, ko živali dosežejo polno spolno zrelost. To se lahko pri različnih sevih podgan v različnih laboratorijih nekoliko razlikuje, npr. pri podganah seva Sprague Dawley se zgodi pri 10 tednih starosti, pri podganah seva Wistar pa pri približno 12 tednih starosti. Matere s potomci je treba usmrtiti 13. dan po porodu ali kmalu zatem. Dan rojstva (tj. ko je končana kotitev) je opredeljen kot poporodni dan 0. Samice, za katere ni dokazov o kopulaciji, se usmrtijo 24–26 dni po zadnjem dnevu obdobja parjenja. Odmerjanje se pri obeh spolih nadaljuje še v obdobju parjenja. Po obdobju parjenja je treba samcem dajati odmerke še vsaj toliko časa, dokler ni doseženo najkrajše skupno obdobje odmerjanja 28 dni. Nato se usmrtijo ali pa se ohranijo pri življenju in se jim še naprej dajejo odmerki za morebitno drugo parjenje, če se šteje za ustrezno.
30. Dnevno dajanje odmerkov starševskim samicam se mora nadaljevati skozi celotno brejost in vsaj do vključno 13. dne po porodu ali dneva pred usmrtitvijo. Pri študijah, pri katerih se preskusna kemikalija prejema z vdihavanjem ali po dermalni poti, se mora odmerjanje nadaljevati vsaj do vključno 19. dne brejosti, pri čemer je treba odmerjanje znova začeti takoj, ko je to mogoče, in najpozneje 4. dne po porodu.
31. Diagram načrta poskusa je prikazan v Dodatku 2.

Postopek parjenja

32. Običajno je treba pri tej študiji uporabiti parjenje 1: 1 (en samec na eno samico). Izjeme so možne v primeru občasnih poginov samcev. Samica mora biti nastanjena z istim samcem, dokler ni dokazov o kopulaciji ali dokler ne pretečeta dva tedna. Vsako jutro je treba samice pregledati za prisotnost semenčic ali vaginalnega zamaška. Dan brejosti 0 je opredeljen kot dan, na katerega so potrjeni dokazi o parjenju (opažen je vaginalni čep ali semenčice). Če parjenje ni uspešno, se lahko razmisli o ponovnem parjenju samic z dokazanimi samci iste skupine.

Velikost legla

33. Četrti dan po skotitvi se lahko velikost posameznega legla prilagodi z naključno izločitvijo odvečnih mladičev, tako da so po možnosti v vsakem leglu štirje ali pet mladičev vsakega spola, odvisno od običajne velikosti legla pri uporabljenem sevu podgan. Dvema od odvečnih mladičev je treba odvzeti vzorce krvi, jih združiti in uporabiti za določitev ravni T4 v serumu. Selektivno izločanje mladičev, npr. na podlagi telesne teže ali zadnjično-genitalne razdalje, ni ustrezno. Kadar zaradi števila mladih samcev in samic ni mogoče, da bi bili v vsakem leglu štirje ali pet mladičev na spol, je sprejemljiva tudi delna prilagoditev (na primer šest samcev in štiri samice). Mladiči se ne izločijo, če velikost legla pade pod ciljno vrednost za izločitev (8 ali 10 mladičev/leglo). Če je nad ciljno vrednostjo za izločitev na voljo samo en mladič, se izloči samo en mladič, ki se mu odvzame vzorec krvi za morebitne ocene T4 v serumu.
34. Če velikost legla ni prilagojena, se 4. dan po porodu usmrtita dva mladiča na leglo, ki se jima odvzamejo vzorci krvi za meritve serumskih koncentracij hormona ščitnice. Če je mogoče, naj bosta dva mladiča na leglo samici, da se mladi samci prihranijo za ocene razvitosti prsnih bradavic, razen če z izločitvijo teh mladičev ne bi bilo več na voljo samic za oceno ob usmrtitvi. Mladiči se ne izločijo, če velikost legla pade pod ciljno vrednost za izločitev 8 ali 10 mladičev na leglo (odvisno od običajne velikosti legla pri uporabljenem sevu podgan). Če je glede na običajno velikost legla na voljo en sam mladič, se izloči samo en mladič, ki se mu odvzame vzorec krvi za morebitne ocene T4 v serumu.

Opazovanja živih živali

Klinična opazovanja

35. Med preskusnim obdobjem so splošna klinična opazovanja potrebna vsaj enkrat na dan, če se opazijo znaki toksičnosti, pa tudi pogosteje. Po možnosti jih je treba opraviti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po vnosu odmerka. Evidentirati je treba pomembne vedenjske spremembe, znake težke ali podaljšane kotitve in vse znake toksičnosti, vključno s smrtnostjo. Pri znakih toksičnosti je treba evidentirati njihov čas nastanka, jakost in trajanje.

Telesna teža in poraba hrane/vode

36. Samce in samice je treba stehitati prvi dan dajanja odmerka, nato pa vsaj enkrat tedensko in ob usmrtitvi. Med brejostjo je treba samice stehitati na dneve 0, 7, 14 in 20, v 24 urah po kotitvi (dan 0 ali 1. dan po porodu) ter vsaj 4. in 13. dan po porodu. O teh opažanjih je treba posebej poročati za vsako odraslo žival.
37. Porabo hrane je treba v obdobju pred parjenjem, med brejostjo in laktacijo meriti vsaj enkrat na teden. Med parjenjem merjenje porabe hrane ni obvezno. V teh obdobjih je treba meriti tudi porabo vode, če se preskusna kemikalija daje s pitno vodo.

Pojatveni ciklusi

38. Pojavne cikluse je treba spremljati pred začetkom tretiranja, da se za študijo izberejo samice z rednimi ciklusi (glej odstavek 22). Dnevno je treba spremljati tudi vaginalne brise, in sicer od začetka obdobja tretiranja do dokazov o parjenju. Če obstajajo pomisleki glede učinkov akutnega stresa, zaradi katerih bi se lahko z začetkom odmerjanja spremenili pojavni ciklusi, lahko laboratoriji preskusne živali izpostavijo za 2 tedna in nato odvzamejo vaginalne brise, da dnevno spremljajo pojavni cikel vsaj dva tedna v obdobju pred parjenjem, pri čemer se spremljanje nadaljuje, dokler ni dokazov o parjenju. Med jemanjem celic nožnice/materničnega vratu je treba paziti, da ne pride do poškodb sluznice in posledično do psevdogavidnosti (7) (8).

Parametri pri potomcih

39. Evidentirati je treba trajanje brejosti, ki se računa od dneva brejosti 0. Vsako leglo je treba pregledati čim prej po skotitvi, da se ugotovijo število in spol mladičev, mrtvorojenih, živorojenih in spačkov (mladičev, ki so znatno manjši od ustreznih kontrolnih mladičev) ter večje nepravilnosti.

40. Žive mladiče je treba prešteti in določiti njihov spol, legla pa je treba stehtati v 24 urah po kotitvi (dan 0 ali 1. dan po porodu) ter vsaj 4. in 13. dan po porodu. Poleg opazanj, opisanih v odstavku 35, je treba evidentirati vsako nenavadno vedenje potomcev.
41. Zadnjično-genitalno razdaljo vsakega mladiča je treba izmeriti na isti poporodni dan, in sicer med poporodnim dnevom 0 in 4. dnevom po porodu. Podatke o telesni teži mladičev je treba zbrati na dan, ko se meri zadnjično-genitalna razdalja, slednjo pa je treba normirati na mero velikosti mladiča, po možnosti kubični koren telesne teže (9). Število prsnih bradavic/areol pri mladih samcih je treba prešteti 12. ali 13. dan po porodu, kot je priporočeno v Smernici OECD 151 (10).

Klinična biokemija

42. Vzorci krvi z določenega mesta se vzamejo po naslednjem razporedu:

- vsaj dvema mladičema na leglo 4. dan po porodu, če število mladičev to omogoča (glej odstavka 33 in 34);
- vsem materam in vsaj dvema mladičema na leglo ob usmrtnitvi 13. dan ter
- vsem odraslim samcem ob usmrtnitvi.

Vsi vzorci krvi se shranijo v ustreznih pogojih. V vzorcih krvi mladičev, starih 13 dni, in odraslih samcev se ocenijo serumske koncentracije hormonov ščitnice (T4). Dodatna ocena T4 v vzorcih krvi mater in mladičev, starih 4 dni, se izvede po potrebi. Po potrebi se lahko izmerijo tudi drugi hormoni. Za analize hormonov ščitnice se lahko kri mladičev združi po leglih. Hormona ščitnice (T4 in TSH) je treba po možnosti meriti „skupaj“.

43. Na spremenljivost in absolutne koncentracije pri določanju hormonov lahko vplivajo naslednji dejavniki:

- čas usmrtnitve zaradi spreminjanja koncentracij hormonov preko dneva;
- način usmrtnitve, da se prepreči nepotreben stres pri živalih, ki lahko vpliva na koncentracije hormonov;
- preskusni kompleti, ki se uporabljajo za določanje hormonov in se lahko razlikujejo po standardnih krivuljah.

44. Vzorce plazme, ki so predvideni posebej za določanje hormonov, je treba odvzeti ob primerljivih urah dneva. Številčne vrednosti, pridobljene pri analiziranju koncentracij hormonov, so pri različnih kompletih za analize, ki so na voljo na trgu, različne.

Patologija

Makroskopska obdukcija

45. Ob usmrtnitvi ali poginu med študijo je treba odrasle živali makroskopsko pregledati za kakršne koli anomalije ali patološke spremembe. Posebno pozornost je treba posvetiti organom reproduktivnega sistema. Evidentirati je treba število ugnездitev. Zjutraj na dan obdukcije je treba pregledati vaginalne brise, da se ugotovi faza pojavnega ciklusa in omogoči korelacija s histopatološkimi preiskavami jajčnikov.
46. Z mod, nadmodkov ter prostate in semenskih mešičkov s koagulacijskimi žlezami kot celote je treba pri vseh odraslih samcih, kot je ustrezno, odstraniti vsa priraščena tkiva in nato čim prej po disekciji izmeriti njihovo mokro težo, da se ne izsušijo. Poleg tega lahko teža neobveznih organov vključuje sistem mišice levator ani z bulbokavernozno mišico, Cowperjevi žlezi in glavico penisa pri samcih ter oba jajčnika (mokra teža) in maternico (vključno z materničnim vratom) pri samicah; če se navedeno vključi, je treba te teže zbrati čim prej po disekciji.
47. Pri poginulih mladičih in mladičih, usmrčenih 13. dan po porodu ali kmalu zatem, je treba skrbno pregledati vsaj zunanost, da se odkrijejo večje nepravilnosti. Posebno pozornost je treba posvetiti zunanjim reproduktivnim genitalijam, pri katerih je treba pregledati, ali so se pojavili znaki spremenjenega razvoja. Na 13. dan je treba shraniti ščitnico enega mladega samca in ene mlade samice na leglo.

48. Pri vseh odraslih živalih je treba shraniti jajčnike, moda, pomožne spolne organe (maternico in maternični vrat, nadmodke, prostato, semenska mešička s koagulacijskimi žlezami), ščitnico in vse organe, na katerih se kažejo makroskopske lezije. Za redni pregled mod in nadmodkov fiksacija v formalinu ni priporočljiva. Sprejemljiva metoda za ta tkiva je uporaba Bouinovega ali prilagojenega Davidsonovega fiksativa (11). Tunico albugineo je dovoljeno nežno in plitvo punktirati na obeh polih organa z iglo, da lahko fiksativ hitro prodre v tkivo.

Histopatologija

49. Podrobno histopatološko preiskavo je treba izvesti na jajčnikih, modih in nadmodkih (s posebnim poudarkom na fazah spermatogeneze in histopatologiji intersticijske celične strukture mod) živali iz skupine z največjim odmerkom in kontrolne skupine. Drugi shranjeni organi, vključno s ščitnicami mladičev in odraslih živali, se lahko pregledajo po potrebi. Teža ščitnice se lahko določi po fiksaciji. Pri odstranjevanju priraščenih tkiv je prav tako potrebna velika previdnost, opravi pa se lahko šele po fiksaciji, da se preprečijo poškodbe tkiv, ki lahko ogrozijo histopatološko analizo. Preiskave je treba razširiti na živali iz skupin z drugimi odmerjanji, če se v skupini z največjim odmerkom opazijo spremembe. Več informacij o disekciji, fiksaciji, sekciji in histopatologiji endokrinih tkiv je na voljo v napotkih o histopatologiji (11).

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

50. Podatke je treba navesti za vsako žival posebej. Poleg tega je treba vse podatke povzeti v obliki preglednice, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa, število živali, poginulih med preskusom ali usmrčenih iz humanih razlogov, čas pogina ali usmrčitve iz humanih razlogov, število plodnih živali, število brijih samic, število živali, ki kažejo znake toksičnosti, opis znakov zaznane toksičnosti, vključno s časom začetka, trajanjem in resnostjo morebitnih toksičnih učinkov, vrsto histopatoloških sprememb in vse ustrezne podatke o leglu. Format zbirnega poročila v obliki preglednice, ki se je izkazal kot zelo koristen za oceno učinkov na razmnoževanje/razvoj, je naveden v Dodatku 3.
51. Zaradi omejenega obsega študije imajo statistične analize v obliki preskusov „pomembnosti“ omejeno vrednost za številne končne točke, zlasti končne točke razmnoževanja. Če se uporabijo statistične analize, mora biti izbrana metoda ustrezna za porazdelitev preučevane spremenljivke, izbrati pa jo je treba pred začetkom študije. Statistična analiza zadnjično-genitalne razdalje in razvitosti prsnih bradavic mora temeljiti na podatkih za posameznega mladiča, pri čemer se upoštevajo učinki legla. Kadar je ustrezno, je enota analize leglo. Statistična analiza telesne teže mladičev mora temeljiti na podatkih za posameznega mladiča, pri čemer se upošteva velikost legla. Zaradi majhnosti skupine je lahko uporaba podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov (npr. za velikost legla), če so na voljo, prav tako koristna kot pomoč pri razlagi študije.

Vrednotenje rezultatov

52. Ugotovitve te toksikološke študije je treba ovrednotiti glede na opažene učinke, obdukcijo in mikroskopske ugotovitve. Vrednotenje vključuje razmerje med odmerkom preskusne kemikalije in navzočnostjo ali odsotnostjo pojava in resnosti anomalij, vključno z makroskopskimi lezijami, ugotovljenimi ciljnimi organi, neplodnostjo, kliničnimi anomalijami, prizadeto zmogljivostjo reproduktivnosti in legla, spremembami telesne mase, učinki na smrtnost in drugimi toksičnimi učinki.
53. Zaradi kratkotrajnega tretiranja samca je treba pri ocenjevanju učinkov na razmnoževanje pri samcih histopatologijo mod in nadmodkov obravnavati skupaj s podatki o plodnosti. Kot pomoč pri razlagi študije je lahko koristna tudi uporaba podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov, ki se nanašajo na razmnoževanje/razvoj (npr. za velikost legla, zadnjično-genitalno razdaljo, razvitost prsnih bradavic, ravni T4 v serumu), če so na voljo.
54. Za kontrolo kakovosti se predlagata zbiranje podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov in izračun koeficientov variacije za številčne podatke, zlasti za parametre, povezane z zaznavanjem endokrinih motilcev. Ti podatki se lahko uporabijo za primerjave, ko se vrednotijo dejanske študije.

Poročilo o preskusu

55. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija:

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana.

Snov iz ene sestavine

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Vehikel (po potrebi):

- utemeljitev izbire vehikla, če ta ni voda.

Preskusne živali:

- uporabljena vrsta/sev;
- število, starost in spol živali;
- izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;
- teža posamezne živali na začetku preskusa.
- utemeljitev vrste, če to ni podgana.

Preskusni pogoji:

- utemeljitev izbire velikosti odmerkov;
- podrobni podatki o formulaciji preskusne kemikalije in pripravi hrane, doseženih koncentracijah, stabilnosti in homogenosti pripravka;
- podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;
- preračunavanje koncentracije preskusne kemikalije v hrani ali vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne teže/dan), če je ustrezno;

- podrobnosti o kakovosti hrane in vode;
- podroben opis postopka naključnega izbiranja mladičev za izločitev, če se izločijo.

Rezultati:

- telesna teža/spremembe telesne teže;
- poraba hrane, in če je na voljo, poraba vode;
- podatki o toksičnem odzivu po spolu in odmerku, vključno s plodnostjo in brejostjo, ter drugi znaki toksičnosti;
- trajanje brejosti;
- toksični ali drugi učinki na razmnoževanje, potomce, poporodno rast itd.;
- vrsta, resnost in trajanje kliničnih opažanj (s podatki o popravljivosti);
- število odraslih samic z normalnim ali nenormalnim pojatvenim ciklusom in trajanje ciklusa;
- število živorojenih in izgub po ugnezditvi;
- podatki o telesni teži mladičev;
- zadnjično-genitalna razdalja vseh mladičev (in telesna teža na dan meritve zadnjično-genitalne razdalje);
- razvitost prsnih bradavic pri mladih samcih;
- ravni ščitničnega hormona pri mladičih, starih 13 dni, in odraslih samcih (ter materah in mladičih, starih 4 dni, če se merijo);
- število mladičev z večjimi vidnimi anomalijami, splošna ocena zunanjih genitalij, število spačkov;
- čas pogina med študijo oziroma ali so živali preživele do zaključka študije;
- število ugnezditev, velikost legla in teže legla ob evidentiranju;
- telesna teža ob usmrstitvi in podatki o teži organov za starševske živali;
- izsledki obdukcije;
- podroben opis ugotovitev histopatoloških preiskav;

- podatki o absorpciji (če so na voljo);
- statistična obdelava rezultatov, če je to primerno.

Obravnava rezultatov.

Sklepne ugotovitve.

Razlaga rezultatov

56. Študija bo zagotovila vrednotenje toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, povezane z dajanjem ponovljenih odmerkov (glej odstavek 5 in 6). Pokazala bo lahko na potrebo po dodatnih preiskavah in zagotovila smernice za zasnovo poznejših študij. Za pomoč pri razlagi rezultatov o razmnoževanju in razvoju glej Smernico OECD 43 (12). Smernica OECD 106 o histološkem vrednotenju preskusov endokrinega in razmnoževalnega sistema pri glodavcih (11) zagotavlja informacije o pripravi in ocenjevanju (endokrinih) organov in vaginalnih brisov, ki so lahko koristne za to smernico za preskušanje.

VIRI

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

-
- (10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 151), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 106), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 43), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV (GLEJ TUDI SMERNICO OECD 150 (6))

Androgenost je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni androgeni hormon (npr. testosteron) v sesalskem organizmu.

Antiandrogenost je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega androgenega hormona (npr. testosterona) v sesalskem organizmu.

Antiestrogenost je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega estrogenega hormona (npr. 17 β -estradiola) v sesalskem organizmu.

Protiščitnično delovanje je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega ščitničnega hormona (npr. T₃) v sesalskem organizmu.

Kemikalija je snov ali zmes.

Toksičnost za razvoj: pojavna oblika toksičnosti za razmnoževanje, ki se pri potomcih kaže kot pred-, ob- in poporodna strukturna ali funkcionalna motnja.

Odmerjanje je splošen izraz, ki vključuje odmerek ter pogostnost in trajanje dajanja odmerka.

Odmerek je količina dane preskusne kemikalije. Izražen je kot masa preskusne kemikalije na enoto telesne teže preskusne živali na dan (npr. mg/kg telesne teže/dan) ali kot konstantna koncentracija v hrani.

Očitna toksičnost je splošen izraz, ki opisuje jasne znake toksičnosti po dajanju preskusne kemikalije. Ti morajo zado-
stovati za oceno nevarnosti in biti takšni, da bi povečanje danega odmerka najverjetneje povzročilo razvoj resnih znakov toksičnosti in verjetno smrt.

Škodovanje plodnosti pomeni motnje razmnoževalnih funkcij ali sposobnosti za razmnoževanje pri samcih ali samicah.

Toksičnost pri materi: škodljivi učinki na breje samice, ki se pojavijo bodisi specifično (neposredni učinek) bodisi nespecifično (posredni učinek).

NOAEL je kratica za raven brez opaženih škodljivih učinkov (no-observed-adverse-effect level). To je največji odmerek, pri katerem ni opaženih škodljivih učinkov zaradi tretiranja.

Estrogenost je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni estrogenski hormon (npr. 17 β -estradiola) v sesalskem organizmu.

Toksičnost za razmnoževanje pomeni škodljive učinke na potomstvo in/ali poškodovane razmnoževalne funkcije ali prizadete sposobnosti za razmnoževanje pri samcih in samicah.

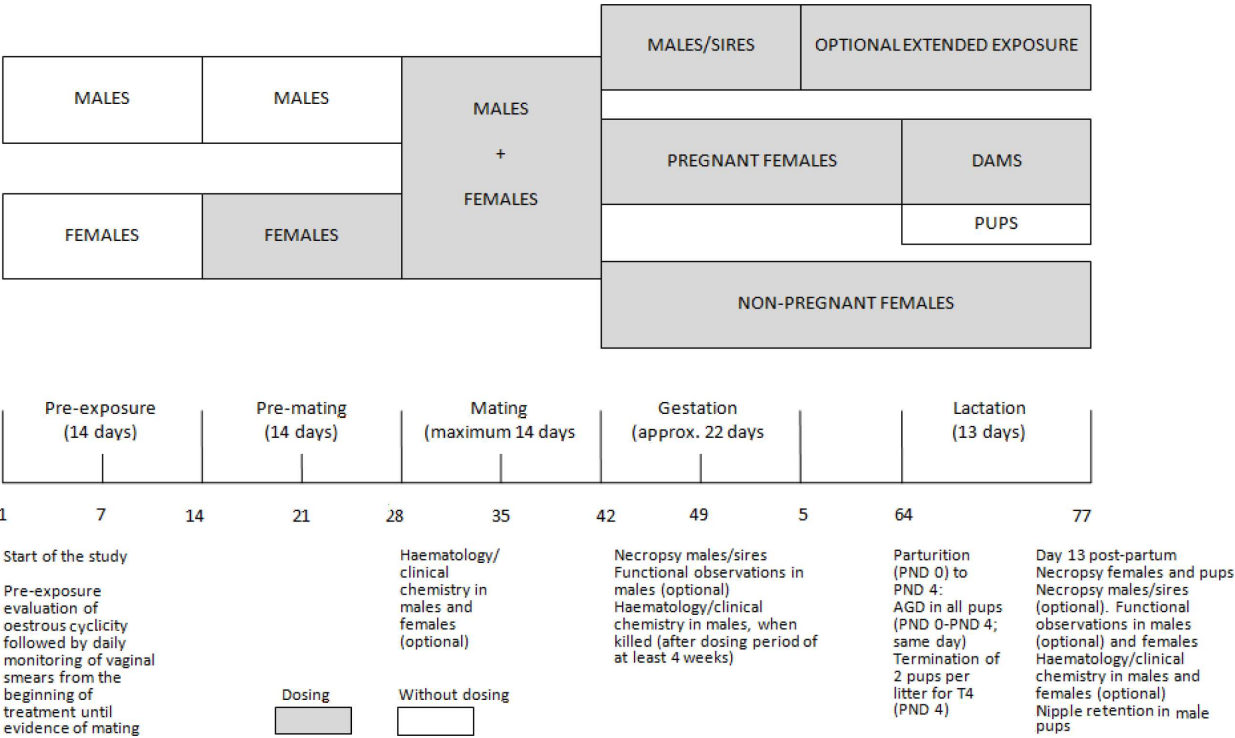
Preskusna kemikalija je vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Ščitnično delovanje je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni ščitnični hormon (npr. T_3) v sesalskem organizmu.

Validacija je znanstveni postopek, oblikovan za določanje zahtev glede delovanja in omejitev preskusne metode ter za prikaz njene zanesljivosti in ustreznosti za določen namen.

Dodatek 2

DIAGRAM NAČRTA ZA POSKUSE Z NAVEDBO NAJDALJŠEGA TRAJANJA ŠTUDIJE NA PODLAGI POLNEGA 14-DNEVNEGA OBDOBJA PARJENJA



Dodatek 3

ZBIRNO POROČILO O UČINKIH NA RAZMNOŽEVANJE/RAZVOJ V OBLIKI PREGLEDNICE

OPAŽANJA	VREDNOSTI				
Odmerjanje (enote)	0 (kontrola)	...	...	...	...
Začetni pari (N)					
Ciklus estrusa (vsaj srednja dolžina in pogostnost nerednih ciklusov)					
Samice, ki kažejo znake kopulacije (N)					
Samice, ki so dosegle brejost (N)					
Dnevi spočetja 1–5 (N)					
Dnevi spočetja 6–... (¹) (N)					
Brejost ≤ 21 dni (N)					
Brejost = 22 dni (N)					
Brejost ≥ 23 dni (N)					
Matere z živimi novorojenimi mladiči (N)					
Matere z živimi mladiči 4. dan po porodu (N)					
Ugnezditve/mati (srednja vrednost)					
Živi mladiči/mati ob rojstvu (srednja vrednost)					
Živi mladiči/mati 4. dan (srednja vrednost)					
Razmerje med spoloma (m/ž) ob rojstvu (srednja vrednost)					
Razmerje med spoloma (m/ž) 4. dan (srednja vrednost)					
Teža legla ob rojstvu (srednja vrednost)					
Teža legla 4. dan (srednja vrednost)					
Teža mladičev ob rojstvu (srednja vrednost)					
Teža mladičev ob meritvi zadnjično-genitalne razdalje (srednja vrednost pri samcih, srednja vrednost pri samicah)					

OPAŽANJA	VREDNOSTI				
Odmerjanje (enote)	0 (kontrola)	...	...	...	...
Zadnjično-genitalna razdalja pri mladičih na isti dan po porodu, od rojstva do 4. dne (srednja vrednost pri samcih, srednja vrednost pri samicah, označi dan po porodu)					
Teža mladičev 4. dan (srednja vrednost)					
Razvitost prsnih bradavic pri mladih samcih 13. dan (srednja vrednost)					
Teža mladičev 13. dan (srednja vrednost)					

MLADIČI Z ANOMALIJAMI

Matere z 0					
Matere z 1					
Matere z ≥ 2					

IZGUBA POTOMSTVA**Predporodna/po ugnezditvi (ugnezditve minus živorojeni)**

Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice s ≥ 3					

Poporodna (živorojeni minus živi 13. dan po porodu)

Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice s ≥ 3					

(1) zadnji dan obdobja parjenja

B.64 KOMBINIRANA ŠTUDIJA TOKSIČNOSTI PRI PONOVLJENIH ODMERKIH S PRESEJALNIM PRESKUSOM TOKSIČNOSTI ZA RAZMNOŽEVANJE/RAZVOJ**UVOD**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 422 (2016). Smernice OECD za preskušanje kemikalij se redno pregledujejo ob upoštevanju znanstvenega napredka. Prvotna smernica za presejalni preskus 422 je bila sprejeta leta 1996 na podlagi protokola za kombinirani presejalni preskus pri ponovljenih odmerkih za razmnoževanje/razvoj, o katerem se je razpravljalo na dveh strokovnih srečanjih, in sicer leta 1990 v Londonu (1) in leta 1992 v Tokiu (2).
2. Ta preskusna metoda združuje del, ki vključuje presejalni preskus toksičnosti za razmnoževanje/razvoj in ki temelji na izkušnjah, pridobljenih v državah članicah z uporabo prvotne metode na obstoječih kemikalijah, ki se proizvajajo v velikih količinah, in pri raziskovalnih preskusih s snovmi za pozitivno kontrolo (3) (4), ter del, ki vključuje preskus toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki, v skladu s Smernico OECD za preskušanje 407 (28-dnevna študija oralne toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki na glodavcih, ki ustreza poglavju B.7 te priloge).
3. Ta preskusna metoda je bila posodobljena z ustreznimi končnimi točkami za endokrine motilce kot nadaljnji ukrep v okviru prednostne dejavnosti, ki jo je OECD začela izvajati leta 1998, da bi pregledala obstoječe smernice za preskušanje ter pripravila nove smernice za presejalne preskuse in preskušanje potencialnih endokrinih motilcev (5). V tem okviru je bila Smernica za preskušanje 407 (ki ustreza poglavju B.7 te priloge) leta 2008 izboljšana s parametri, primernimi za zaznavanje endokrinega delovanja preskusnih kemikalij. Namen posodobitve Smernice za preskušanje 422 je bil vključitev nekaterih ustreznih končnih točk za endokrine motilce v smernice za presejalno preskušanje, pri katerih obdobja izpostavljenosti zajemajo nekatera občutljiva obdobja med razvojem (pred rojstvom in malo po rojstvu).
4. Izbrane dodatne končne točke, pomembne za endokrine motilce, ki so tudi del Smernice za preskušanje št. 443 (razširjene študije toksičnosti za razmnoževanje na eni generaciji, ki ustreza poglavju B.56 te priloge), so bile v Smernico za preskušanje št. 422 vključene na podlagi študije izvedljivosti, s katero so se obravnavala znanstvena in tehnična vprašanja njihove vključitve ter morebitne prilagoditve načrta preskusa, potrebne za njihovo vključitev (6).
5. Ta preskusna metoda naj bi zagotovila omejene informacije v zvezi z učinki preskusne kemikalije na sposobnost razmnoževanja pri samcih in samicah, kot so funkcija spolnih žlez, obnašanje pri parjenju, spočetje, razvoj zarodka in kotitev. Ni alternativa obstoječim preskusnim metodam B.31, B.34, B.35 ali B.56 niti jih ne nadomešča.

ZAČETNI PREUDARKI

6. Pri ocenjevanju in vrednotenju toksičnih lastnosti preskusne kemikalije se lahko metoda s ponavljanjem odmerkov uporabi za določitev oralne toksičnosti, potem ko se s preskusi akutne toksičnosti že pridobijo začetne informacije o toksičnosti. Ta študija zagotavlja informacije o morebitnih nevarnostih za zdravje, ki jih lahko povzroči večkratna izpostavljenost v razmeroma omejenem obdobju. Metoda obsega osnovno študijo toksičnosti s ponavljajočimi se odmerki, ki se lahko uporabi za kemikalije, za katere ni upravičena 90-dnevna študija (npr. če obseg proizvodnje ne presega določenih mej), ali pa se izvede kot predhodna študija za dolgoročno študijo. Pri izvajanju študije je treba upoštevati vodilna načela in premisleke iz Smernice OECD 19 o prepoznavanju, oceni in uporabi kliničnih znakov kot humanih končnih točk za preskusne živali, ki se uporabljajo pri ocenah varnosti (7).
7. Poleg tega vključuje presejalni preskus toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, zato se lahko uporabi za zagotovitev začetnih informacij o morebitnih učinkih na sposobnost razmnoževanja pri samcih in samicah, kot so funkcija spolnih žlez, obnašanje pri parjenju, spočetje, razvoj zarodka in kotitev, bodisi v zgodnji fazi ocenjevanja toksikoloških lastnosti preskusnih kemikalij bodisi v zvezi s kemikalijami, ki vzbujajo zaskrbljenost. Ta preskusna metoda ne zagotavlja popolnih informacij o vseh vidikih razmnoževanja in razvoja. Zlasti zagotavlja samo omejene načine, kako po rojstvu zaznati pojavnne oblike izpostavljenosti pred rojstvom ali učinke, ki jih lahko povzroči izpostavljenost po rojstvu. Zaradi (med drugim) selektivnosti končnih točk in kratkotrajnosti študije ta metoda ne zagotavlja dokazov za dokončne trditve o neobstoju učinkov na razmnoževanje/razvoj. Če ni podatkov iz drugih preskusov toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, so poleg tega pozitivni rezultati koristni za začetno oceno nevarnosti in prispevajo k odločitvam v zvezi z nujnostjo in časovnim okvirom dodatnega preskušanja.

8. Rezultate, ki se dobijo s parametri, povezanimi z endokrinim sistemom, je treba obravnavati znotraj temeljnega okvira OECD za preskušanje in ocenjevanje kemikalij, ki povzročajo endokrine motnje (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) (8). V tem temeljnem okviru je izboljšana Smernica OECD za preskušanje 422 vključena na ravni 4 kot preskus *in vivo*, ki zagotavlja podatke o škodljivih učinkih na ustrezne končne točke za endokrini sistem. Vendar zgolj endokrinega signala ni mogoče šteti za zadosten dokaz, da je preskusna kemikalija endokrini motilec.
9. Pri preskusni metodi je poudarek tudi na nevroloških učinkih kot specifični končni točki, poudarjena je tudi potreba po pozornem kliničnem opazovanju živali, da se pridobi čim več informacij. S to metodo naj bi se opredelile kemikalije z nevrotoksičnim potencialom, zaradi česar je morda upravičena dodatna poglobljena raziskava tega vidika. Poleg tega lahko metoda v osnovi nakaže imunološke učinke.
10. Če ni podatkov iz drugih študij sistemske toksičnosti, toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, nevrotoksičnosti in/ali imunotoksičnosti, so pozitivni rezultati koristni za začetno oceno tveganj in prispevajo k odločitvam v zvezi z nujnostjo in časom dodatnega preskušanja. Preskus je lahko še zlasti koristen v okviru osnovnega pregleda OECD v zvezi s podatki o kemikaliji (SIDS) za oceno obstoječih kemikalij, o katerih je na voljo malo ali nič toksikoloških informacij, in se lahko uporabi namesto dveh ločenih preskusov toksičnosti pri ponovljenih odmerkih (Smernica OECD za preskušanje 407, ki ustreza poglavju B.7 te priloge) oziroma toksičnosti za razmnoževanje/razvoj (Smernica OECD za preskušanje 421, ki ustreza poglavju B.63 te priloge). Uporabi se lahko tudi kot študija za določanje območja odmerka za obsežnejše razmnoževalne/razvojne študije ali kadar je kako drugače pomembna.
11. Na splošno se domneva, da obstajajo razlike v občutljivosti med brejimi in nebrejimi živalmi. Posledično je lahko pri tem kombiniranem preskusu bolj zapleteno določiti velikosti odmerkov, ki so ustrezni za oceno tako splošne sistemske toksičnosti kot specifične toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, kot pa če se posamezni preskusi izvedejo ločeno. Poleg tega je lahko razlaga rezultatov preskusa v zvezi s splošno sistemsko toksičnostjo težja, kot če se izvede ločena študija s ponovljenimi odmerki, zlasti če serumski in histopatološki parametri v študiji niso ocenjeni hkrati. Zaradi teh tehničnih težav so za izvajanje tega kombiniranega presejalnega preskusa potrebne bogate izkušnje s preskušanjem toksičnosti. Po drugi strani pa lahko kombinirani preskus, poleg tega da vključuje manjše število živali, zagotovi tudi boljši način za razlikovanje med neposrednimi učinki na razmnoževanje/razvoj in učinki, ki so glede na druge (sistemske) učinke drugotnega pomena.
12. Pri tem preskusu je obdobje odmerjanja daljše kot pri običajni 28-dnevni študiji s ponovljenimi odmerki. Vendar se pri njem uporabi manj živali vsakega spola na skupino, kot če se običajna 28-dnevna študija s ponovljenimi odmerki izvede poleg presejalnega preskusa toksičnosti za razmnoževanje/razvoj.
13. Pri tej preskusni metodi je predvideno oralno dajanje preskusne kemikalije. Če se uporabijo drugi načini izpostavljenosti, so morda potrebne prilagoditve.
14. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki predudarki niso potrebni.
15. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA

16. Preskusna kemikalija se daje v stopnjevanih odmerkih več skupinam samcev in samic. Samcem je treba dajati odmerke najmanj štiri tedne, do vključno dneva pred predvideno usmrtnostjo (to vključuje vsaj dva tedna pred parjenjem, obdobje parjenja in približno dva tedna po parjenju). Glede na omejeno obdobje odmerjanja pred parjenjem pri samcih plodnost morda ni posebno občutljiv kazalnik toksičnosti za moda. Zato je bistven podroben

histološki pregled mod. Kombinacija dvotedenskega obdobja odmerjanja pred parjenjem in poznejših opazovanj parjenja/plodnosti s skupno vsaj štiritedenskim obdobjem odmerjanja, ki mu sledi podroben histopatološki pregled spolnih žlez samcev, se šteje za zadostno, da se lahko zazna večina učinkov na plodnost pri samcih in spermatoogenezo.

17. Samicam je treba dajati odmerke med celotno študijo. To vključuje dva tedna pred parjenjem (da se zajameta vsaj dva popolna pojatvena cikla), različen čas do spočetja, trajanje brejosti in vsaj 13 dni po kotitvi, do vključno dneva pred predvideno usmrtnitvijo.
18. Trajanje študije po aklimatizaciji in oceni pojatvenega cikla pred odmerjanjem je odvisno od delovanja samice in traja približno 63 dni (vsaj 14 dni pred parjenjem, (do) 14 dni parjenja, 22 dni brejosti, 13 dni laktacije).
19. V obdobju dajanja odmerkov je treba živali vsak dan pozorno opazovati, ali kažejo znake zastrupitve. Na živalih, ki med preskusom poginejo ali so usmrčene, se opravi obdukcija, ob koncu preskusa pa se tudi preživele živali usmrtijo in se na njih opravi obdukcija.

OPIS METODE

Izbira živalskih vrst

20. Pri tej preskusni metodi naj bi se uporabljale podgane. Če se parametri, določeni v tej smernici za preskušanje 422, preiskujejo na drugi vrsti glodavcev, je treba to podrobno utemeljiti. V mednarodnem validacijskem programu za zaznavanje endokrinih motilcev na podlagi Smernice OECD za preskušanje 407 je bila podgana edina uporabljena vrsta. Sevi z nizko plodnostjo ali dobro znano visoko pojavnostjo razvojnih napak se ne smejo uporabljati. Uporabiti je treba zdrave živali, ki se še niso parile in niso bile izpostavljene predhodnim preskusnim postopkom. Opredeliti je treba vrsto, sev, spol, težo in starost preskusnih živali. Na začetku študije morajo biti razlike v teži uporabljenih živali čim manjše in ne smejo presegati $\pm 20\%$ povprečne teže za vsak spol. Če se študija izvaja kot predhodna študija za dolgotrajno študijo ali študijo celotne generacije, je priporočljivo, da se v obeh študijah uporabijo živali iz istega seva in vira.

Nastanitev in hranjenje

21. Vsi postopki morajo biti v skladu z lokalnimi standardi oskrbe laboratorijskih živali. Temperatura v prostoru s preskusnimi živalmi mora znašati 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). Relativna vlažnost mora biti vsaj 30-odstotna in po možnosti ne sme presegati 70 %, razen med čiščenjem prostora. Osvetlitev mora biti umetna s svetlobnim ciklom 12 ur svetlobe in 12 ur teme. Za hranjenje se lahko uporablja običajna laboratorijska hrana z neomejeno količino pitne vode. Na izbiro hrane lahko vpliva potreba po zagotovitvi ustrezne primesi preskusne kemikalije, če se daje po tej metodi.
22. Živali morajo biti nastanjene v majhnih skupinah istega spola; posamično so lahko nastanjene, če je to znanstveno utemeljeno. Pri skupinski nastanitvi je lahko v kletki največ pet živali. Parjenje se mora izvajati v kletkah, ki so primerne za ta namen. Breje samice morajo biti v svojih kletkah in imeti na voljo material za izdelavo gnezda. Samice v laktaciji so v svojih kletkah skupaj z mladiči.
23. Hrano je treba redno analizirati, da ne vsebuje kontaminantov. Vzorec hrane je treba hraniti, dokler poročilo ni končano.

Priprava živali

24. Zdrave mlade odrasle živali se naključno izberejo ter dodelijo tretiranim skupinam in kletkam. Kletke je treba razporediti tako, da se čim bolj zmanjšajo morebitni učinki, ki nastanejo zaradi razporeditve kletk. Živali se označijo z enkratnimi oznakami in zadržijo v kletkah vsaj pet dni pred začetkom študije, da se prilagodijo na laboratorijske razmere.

Priprava odmerkov

25. Priporoča se, da se preskusna kemikalija daje oralno, razen če se šteje drug način dajanja za primernejšega. Če se izbere oralni način, se preskusna kemikalija običajno daje z gavažo, lahko pa tudi s hrano ali pitno vodo.

26. Po potrebi se preskusna kemikalija raztopi ali suspendira v ustreznem vehiklu. Priporočljivo je, da se, če je mogoče, najprej preuči možnost uporabe vodne raztopine/suspenzije, nato raztopine/suspenzije v olju (npr. koruznem), šele potem pa možnost raztopine v drugih vehiklih. Pri nevodnih vehiklih je treba poznati njihove toksične lastnosti. Določiti je treba stabilnost in homogenost preskusne kemikalije v vehiklu.

POSTOPEK

Število in spol živali

27. Priporočljivo je, da se v vsaki skupini začne z vsaj 10 samci in 12–13 samicami. Pri samicah se pred izpostavitvijo oceni pojatvena cikličnost; živali, ki nimajo značilnih 4–5-dnevnih ciklusov, se ne vključijo v študijo; zato se priporočajo dodatne samice za zagotovitev, da je v vsaki skupini 10 samic. Razen v primeru izrazitih toksičnih učinkov naj bi se tako dobilo vsaj 8 brejih samic na skupino, kar je običajno najnižje sprejemljivo število brejih samic na skupino. Cilj je dobiti dovolj brejih samic in mladičev, da je zagotovljeno smiselno ovrednotenje potenciala preskusne kemikalije za vplivanje na plodnost, brejost in materinsko obnašanje ter sesanje, rast in razvoj potomcev F_1 od spočetja do 13. dne po skotitvi. Če so med potekom študije načrtovane usmrtitve, je treba število povečati za število živali, predvidenih za usmrtitev pred zaključkom študije. Razmisliti je treba o dodatni satelitski skupini petih živali vsakega spola v kontrolni skupini in skupini, tretirani z največjim odmerkom, na katerih bi se vsaj 14 dni po tretiranju opazovale popravljivost, obstojnost ali zapoznelost nastopa sistemskih toksičnih učinkov. Živali iz satelitske skupine se ne parijo, zato se ne uporabijo za oceno toksičnosti za razmnoževanje/razvoj.

Odmerjanje

28. Običajno je treba uporabiti najmanj tri preskusne skupine in eno kontrolno skupino. Če niso na voljo ustrezni podatki o splošni toksičnosti, se lahko opravi študija za določanje območja (na živalih istega seva in izvora), s pomočjo katere se določijo odmerki, ki bodo uporabljeni. Razen tretiranja s preskusno kemikalijo je treba živali v kontrolni skupini obravnavati enako kot živali v preskusni skupini. Če se pri dajanju preskusne kemikalije uporablja vehikel, mora kontrolna skupina prejeti največjo uporabljeno količino vehikla.
29. Pri izbiri velikosti odmerkov je treba upoštevati vse obstoječe podatke o toksičnosti in (toksiko-)kinetiki, ki so na voljo. Upoštevati je treba tudi, da lahko obstajajo razlike v občutljivosti med brejimi in nebrejimi živalmi. Izbrati je treba največjo velikost odmerka, ki povzroči toksične učinke, ne pa tudi pogina ali očitnega trpljenja. Nato je treba izbrati padajoče zaporedje velikosti odmerkov, da se pokažejo vsi odzivi, ki so odvisni od odmerjanja, in ugotovi največja velikost odmerka, pri kateri ni škodljivih učinkov. Velikokrat je najbolje uporabiti dva- do štirikratne intervale, namesto zelo velikih intervalov (npr. večjih od desetkratnika) med odmerjanji pa je pogosto primerneje dodati še četrto preskusno skupino.
30. Če se ugotovijo splošna toksičnost (npr. zmanjšana telesna teža, učinki na jetra, srce, pljuča ali ledvice itd.) ali druge spremembe, ki morda niso toksične reakcije (npr. zmanjšan vnos hrane, povečanje jeter), je potrebna previdnost pri razlagi ugotovljenih učinkov na endokrine občutljive končne točke.

Mejni preskus

31. Če oralna študija pri odmerku, velikem najmanj 1 000 mg/kg telesne teže/dan, ali pri enakovrednem deležu v hrani ali pitni vodi pri vnosu s hrano ali pitno vodo (na podlagi telesne teže), pri katerem so uporabljeni postopki, opisani za to študijo, ne povzroči opaznih toksičnih učinkov in če na podlagi podatkov o strukturno sorodnih snoveh toksičnost ni pričakovana, popolna študija z več velikostmi odmerkov morda ni potrebna. Mejni preskus se uporabi, razen če izpostavljenost človeka nakazuje potrebo po uporabi večjega odmerka. Pri drugih vrstah prejetja, na primer pri vdihavanju ali dermalni aplikaciji, lahko fizikalno-kemijske lastnosti preskusne kemikalije pogosto določajo največjo dosegljivo izpostavljenost.

Dajanje odmerkov

32. Živalim se dajejo odmerki preskusne kemikalije sedem dni na teden. Če se preskusna kemikalija daje z gavažo, jo je treba živali dati v enkratnem odmerku z uporabo želodčne sonde ali primerne intubacijske kanile. Največja količina tekočine, ki se lahko da naenkrat, je odvisna od velikosti preskusne živali. Količina ne sme presegati 1 ml/100 g telesne teže, razen v primeru vodnih raztopin, za katere se lahko uporabi 2 ml/100 g telesne teže. Razen pri dražilnih

ali jedkih preskusnih kemikalijah, ki pri večjih koncentracijah navadno povzročijo močnejše učinke, je treba s prilagajanjem koncentracije čim bolj zmanjšati spremenljivost preskusne količine, da se zagotovi stalna količina pri vseh velikostih odmerkov.

33. Pri preskusnih kemikalijah, ki se dajejo s hrano ali pitno vodo, je treba zagotoviti, da količine uporabljene preskusne kemikalije ne vplivajo na normalno prehranjevanje ali vodno ravnotežje. Če se preskusna kemikalija daje s hrano, se lahko uporabi konstantna koncentracija v hrani (ppm) ali pa konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali; uporabljeni način je treba navesti. Če se preskusna kemikalija daje z gavažo, je treba odmerke dajati vsak dan ob približno istem času in jih najmanj enkrat tedensko prilagajati, da se vzdržuje konstantna velikost odmerka glede na telesno težo živali. Če se kombinirana študija izvaja kot predhodna študija za dolgoročno študijo toksičnosti ali popolno študijo toksičnosti za razmnoževanje, je treba v obeh študijah uporabiti podobno hrano.

Načrt za poskus

34. Odmerjanje obema spoloma se mora začeti 2 tedna pred parjenjem, potem ko so se živali aklimatizirale vsaj pet dni in ko so bile samice pregledane, ali imajo normalen pojavni cikel (v dvotedenskem obdobju pred tretiranjem). Študija mora biti načrtovana tako, da se ocenjevanje pojavnega ciklusa začne kmalu potem, ko živali dosežejo polno spolno zrelost. To se lahko pri različnih sevih podgan v različnih laboratorijih nekoliko razlikuje, npr. pri podganah seva Sprague Dawley se zgodi pri 10 tednih starosti, pri podganah seva Wistar pa pri približno 12 tednih starosti. Matere s potomci je treba usmrtiti 13. dan po porodu ali kmalu zatem. Da se omogoči postenje mater čez noč pred odvzemom krvi (če je zaželena ta možnost), mater in njihovega potomstva ni treba nujno usmrtiti isti dan. Dan rojstva (tj. ko je končana kotitev) je opredeljen kot poporodni dan 0. Samice, za katere ni dokazov o kopulaciji, se usmrtijo 24–26 dni po zadnjem dnevu obdobja parjenja. Odmerjanje se pri obeh spolih nadaljuje še v obdobju parjenja. Po obdobju parjenja je treba samcem dajati odmerke še vsaj toliko časa, dokler ni doseženo najkrajše skupno obdobje odmerjanja 28 dni. Nato se usmrtijo ali pa se ohranijo pri življenju in se jim še naprej dajejo odmerki za morebitno drugo parjenje, če se šteje za ustrezno.
35. Dnevno dajanje odmerkov starševskim samicam se mora nadaljevati skozi celotno brejost in vsaj do vključno 13. dne po porodu ali dneva pred usmrtnitvijo. Pri študijah, pri katerih se preskusna kemikalija prejema z vdihavanjem ali po dermalni poti, se mora odmerjanje nadaljevati vsaj do vključno 19. dne brejosti, pri čemer je treba odmerjanje znova začeti takoj, ko je to mogoče, in najpozneje 4. dan po porodu.
36. Če so vključene živali iz satelitske skupine, predvidene za nadaljnja opazovanja, se ne pariyo. Ohraniti jih je treba še vsaj 14 dni po prvi predvideni usmrtnitvi mater, in sicer brez kakršnega koli tretiranja, da se zazna zapoznel nastop, obstojnost ali izginotje toksičnih učinkov.
37. Diagram načrta poskusa je prikazan v Dodatku 2.

Pojatveni ciklusi

38. Pojavne cikle je treba spremljati pred začetkom tretiranja, da se za študijo izberejo samice z rednimi cikli (glej odstavek 27). Dnevno je treba spremljati tudi vaginalne brise, in sicer od začetka obdobja tretiranja do dokazov o parjenju. Če obstajajo pomisleki glede učinkov akutnega stresa, zaradi katerega bi se lahko z začetkom odmerjanja spremenili pojavni cikli, lahko laboratoriji preskusne živali izpostavijo za 2 tedna in nato odvzamejo vaginalne brise, da spremljajo pojavni cikel vsaj dva tedna v obdobju pred parjenjem, dokler ni dokazov o parjenju. Med jemanjem celic nožnice/materničnega vratu je treba paziti, da ne pride do poškodb sluznice in posledično do psevdogravidnosti (8) (9).

Postopek parjenja

39. Običajno je treba pri tej študiji uporabiti parjenje 1: 1 (en samec na eno samico). Izjeme so možne v primeru občasnih poginov samcev. Samica mora biti nastanjena z istim samcem, dokler ni dokazov o kopulaciji ali dokler ne pretečeta dva tedna. Vsako jutro je treba samice pregledati za prisotnost semenčic ali vaginalnega zamaška. Dan brejosti 0 je opredeljen kot dan, na katerega so potrjeni dokazi o parjenju (opažen je vaginalni čep ali semenčice). Če parjenje ni bilo uspešno, se lahko razmisli o ponovnem parjenju samic z dokazanimi samci iste skupine.

Velikost legla

40. Četrty dan po skotitvi se lahko velikost posameznega legla prilagodi z naključno izločitvijo odvečnih mladičev, tako da so po možnosti v vsakem leglu štirje ali pet mladičev vsakega spola, odvisno od običajne velikosti legla pri uporabljenem sevu podgan. Dvema od odvečnih mladičev je treba odvzeti vzorce krvi, jih združiti in uporabiti za določitev ravni T4 v serumu. Selektivno izločanje mladičev, npr. na podlagi telesne teže ali zadnjično-genitalne razdalje, ni ustrezno. Kadar zaradi števila mladih samcev in samic ni mogoče, da bi bili v vsakem leglu štirje ali pet mladičev na spol, je sprejemljiva tudi delna prilagoditev (na primer šest samcev in štiri samice). Mladiči se ne izločijo, če velikost legla pade pod ciljno vrednost za izločitev (8 ali 10 mladičev/leglo). Če je nad ciljno vrednostjo za izločitev na voljo samo en mladič, se izloči samo en mladič, ki se mu odvzame vzorec krvi za morebitne ocene T4 v serumu.
41. Če velikost legla ni prilagojena, se 4. dan po porodu usmrtita dva mladiča na leglo, ki se jima odvzamejo vzorci krvi za meritve serumskih koncentracij hormona ščitnice. Če je mogoče, naj bosta dva mladiča na leglo samici, da se mladi samci prihranijo za ocene razvitosti prsnih bradavic, razen če izločitev teh mladičev pomeni, da ni več na voljo samic za oceno ob usmrtitvi. Mladiči se ne izločijo, če velikost legla pade pod ciljno vrednost za izločitev 8 ali 10 mladičev na leglo (odvisno od običajne velikosti legla pri uporabljenem sevu podgan). Če je glede na običajno velikost legla na voljo en sam mladič, se izloči samo en mladič, ki se mu odvzame vzorec krvi za morebitne ocene T4 v serumu.

Opažanja

42. Splošna klinična opazovanja je treba opraviti vsaj enkrat na dan, po možnosti vsak dan ob istem času in ob upoštevanju obdobja največje intenzivnosti pričakovanih učinkov po odmerjanju. Evidentirati je treba podatke o zdravstvenem stanju živali. Živali je treba vsaj dvakrat na dan opazovati za odkrivanje obolevnosti in smrtnosti.
43. Enkrat pred prvo izpostavljenostjo (da se omogočijo primerjave na istem osebk) in nato vsaj enkrat na teden je treba opraviti natančna klinična opazovanja vseh starševskih živali. Ta opazovanja je treba opraviti zunaj kletk, v katerih živali bivajo, na standardnem mestu in po možnosti vsak dan ob istem času. Opažanja je treba skrbno dokumentirati, po možnosti s pomočjo točkovanj, ki jih izrecno določi preskuševalni laboratorij. Prizadevati si je treba, da se preskusni pogoji čim manj spreminjajo in da opazovanja po možnosti opravijo opazovalci, ki s tretiranjem niso seznanjeni. Pozornost je med drugim treba nameniti vsem spremembam na koži, kožuhu, očeh in sluznicah, pojavu sekrecije in ekskrecije ter delovanju avtonomnega živčevja (npr. solzenju, piloerekciji, velikosti zenic in nenavadnemu vzorcu dihanja). Prav tako je treba evidentirati spremembe v hoji, drži in odzivu na ravnanje z živalmi, pa tudi prisotnost kloničnih ali toničnih gibov, stereotipij (npr. prekomernega čiščenja, ponavljajočega se vrtenja v krogu), težke ali podaljšane kotitve ali nenormalnega vedenja (npr. samopohabe, vzvratne hoje) (10).
44. Enkrat med študijo je treba pri petih samcih in petih samicah, naključno izbranih iz vsake skupine, oceniti senzorično reaktivnost na različne vrste dražljajev (npr. slušni, vizualni in proprioceptivni dražljaji) (8) (9) (11), moč prijema (12) in motorično aktivnost (13). Nadaljnje podrobnosti glede mogočih postopkov so na voljo v navedenih virih. Uporabiti je mogoče tudi druge postopke, ki v njih niso opisani. Pri samcih je treba ta funkcionalna opazovanja izvesti proti koncu njihovega obdobja odmerjanja, malo pred predvideno usmrtitvijo, vendar pred vzorčenjem krvi za hematološke ali kliničnokemijske preiskave (glej odstavke 53–56, vključno z opombo 1). Samice morajo biti med temi funkcionalnimi preskusi v fiziološko podobnem stanju, po možnosti pa je treba preskuse izvesti enkrat v zadnjem tednu laktacije (npr. LD 6-13), malo pred predvideno usmrtitvijo. Čas ločitve mater od mladičev naj bo čim krajši.
45. Funkcionalna opazovanja, izvedena proti koncu študije, se lahko izpustijo, če je študija izvedena kot predhodna študija za poznejšo (90-dnevno) študijo subkronične toksičnosti ali dolgoročno študijo. V takem primeru je treba funkcionalna opazovanja vključiti v to dopolnilno študijo. Po drugi strani pa lahko podatki o funkcionalnih opazovanjih, pridobljeni v tej študiji s ponavljajočimi se odmerki, pomagajo pri določanju velikosti odmerkov za poznejšo študijo subkronične toksičnosti ali dolgoročno študijo.
46. Izjemoma se lahko funkcionalna opazovanja izpustijo tudi za skupine, ki sicer kažejo znake zastrupitve v tolikšnem obsegu, da bi to močno oviralo izvedbo funkcionalnega preskusa.
47. Evidentirati je treba trajanje brejosti, ki se računa od dneva brejosti 0. Vsako leglo je treba pregledati čim prej po skotitvi, da se ugotovijo število in spol mladičev, mrtvorojenih, živorojenih in spačkov (mladičev, ki so znatno manjši od ustreznih kontrolnih mladičev) ter večje nepravilnosti.
48. Žive mladiče je treba prešteti in določiti njihov spol, legla pa je treba stehati v 24 urah po kotitvi (dan 0 ali 1. dan po porodu) ter vsaj na 4. in 13. dan po porodu. Poleg opažanj glede staršev (glej odstavka 43 in 44) je treba evidentirati vsako nenavadno vedenje potomcev.

49. Zadnjično-genitalno razdaljo vsakega mladiča je treba izmeriti na isti poporodni dan, in sicer med poporodnim dnem 0 in 4. dnem po porodu. Podatke o telesni teži mladičev je treba zbrati na dan, ko se meri zadnjično-genitalna razdalja, slednjo pa je treba normirati na mero velikosti mladiča, po možnosti kubični koren telesne teže (14). Število prsnih bradavic/areol pri mladih samcih je treba prešteti 12. ali 13. dan po porodu, kot je priporočeno v Smernici OECD 151 (15).

Telesna teža in poraba hrane/vode

50. Samce in samice je treba stehtati prvi dan dajanja odmerka, nato pa vsaj enkrat tedensko in ob usmrtnitvi. Med brejostjo je treba samice stehtati na dneve 0, 7, 14 in 20 ter v 24 urah po kotitvi (dan 0 ali 1. dan po porodu) in vsaj 4. in 13. dan po porodu. O teh opažanjih je treba posebej poročati za vsako odraslo žival.
51. Porabo hrane je treba v obdobju pred parjenjem, med brejostjo in laktacijo meriti vsaj enkrat na teden. Med parjenjem merjenje porabe hrane ni obvezno. V teh obdobjih je treba meriti tudi porabo vode, če se preskusna kemikalija daje s tem medijem.

Hematologija

52. Enkrat med študijo je treba pri petih samcih in petih samicah, naključno izbranih iz vsake skupine, opraviti naslednje hematološke preiskave: hematokrit, koncentracija hemoglobina, število eritrocitov, retikulociti, skupno in diferencialno število levkocitov, število trombocitov ter čas/zmožnost koagulacije. Druge preiskave, ki jih je treba opraviti, če imajo preskusna kemikalija ali njeni domnevni metaboliti oksidativne lastnosti oziroma če obstaja sum, da jih imajo, vključujejo koncentracijo methemoglobina in Heinzova telesca.
53. Vzorce krvi je treba vzeti na imenovanem mestu. Samice morajo biti med vzorčenjem v fiziološko podobnem stanju. Da se preprečijo praktične težave, povezane z različnim nastopom brejosti, se lahko vzorci krvi samicam odvzamejo ob koncu obdobja pred parjenjem, namesto da se vzorčijo neposredno pred postopkom evtanazije živali ali med njim. Vzorce krvi samcev je treba po možnosti odvzeti neposredno pred postopkom evtanazije živali ali med njim. Druga možnost je, da se samcem kri odvzame tudi ob koncu obdobja pred parjenjem, če je bila za samice izbrana ta časovna točka.
54. Vzorce krvi je treba shraniti v ustreznih pogojih.

Klinična biokemija

55. Klinične biokemične določitve za ugotavljanje glavnih toksičnih učinkov v tkivih in zlasti učinkov na ledvice in jetra je treba opraviti na vzorcih krvi, pridobljenih od izbranih petih samcev in petih samic iz vsake skupine. Priporočeno je, da živali pred jemanjem vzorcev krvi čez noč postimo.⁽¹⁾ Preiskave plazme ali seruma morajo vključevati določanje natrija, kalija, glukoze, skupnega holesterola, sečnine, kreatinina, skupnih proteinov in albumina, najmanj dveh encimov, ki sta kazalnika hepatoceličnih učinkov (kot so alanin-aminotransferaza, aspartat-aminotransferaza in sorbitol-dehidrogenaza), in žolčnih kislin. Meritve dodatnih encimov (jetrnega ali drugega izvora) in bilirubina lahko v nekaterih okoliščinah zagotovijo koristne informacije.
56. Vzorce krvi z določenega mesta se vzamejo po naslednjem razporedu:
- vsaj dvema mladičema na leglo 4. dan po porodu, če število mladičev to omogoča (glej odstavka 40 in 41);
 - vsem materam in vsaj dvema mladičema na leglo ob usmrtnitvi 13. dan ter
 - vsem odraslim samcem ob usmrtnitvi.

Vsi vzorci krvi se shranijo v ustreznih pogojih. V vzorcih krvi mladičev, starih 13 dni, in odraslih samcev se ocenijo serumske koncentracije hormonov ščitnice (T4). Dodatna ocena T4 v vzorcih krvi mater in mladičev, starih 4 dni, se izvede po potrebi. Po potrebi se lahko izmerijo tudi drugi hormoni. Za analize hormonov ščitnice se lahko kri mladičev združi po leglih. Hormona ščitnice (T4 in TSH) je treba po možnosti meriti „skupaj“.

⁽¹⁾ Za številne preiskave seruma in plazme, zlasti za določanje glukoze, se priporoča postenje čez noč. Glavni razlog za to je, da bi povečana spremenljivost, ki bi se zagotovo pojavila, če se žival ne bi postila, lahko prikrila manj opazne učinke in otežila razlago. Po drugi strani pa postenje čez noč lahko vpliva na splošno presnovo (brejih) živali, zmoti laktacijo in vedenje med dojenjem, zlasti v študijah, pri katerih se kemikalija daje s hrano, pa lahko zmoti dnevno izpostavljenost preskusni kemikaliji. Če se uporabi postenje čez noč, je treba klinične biokemične preiskave izvesti po zaključku funkcionalnih opazovanj v četrtem tednu študije pri samcih. Samice je treba ohraniti pri življenju še dodaten dan po odstranitvi mladičev, na primer na 13. dan po porodu. Matere je treba postiti čez noč na 13.–14. dan laktacije, kri, odvzeta ob usmrtnitvi, pa se uporabi za kliničnokemijske parametre.

57. Po želji se lahko v zadnjem tednu študije pri petih naključno izbranih samcih iz vsake skupine opravijo naslednje analize urina, dobljenega z zbiranjem v določenih časovnih obdobjih: videz, količina, osmolalnost ali specifična teža, pH, proteini, glukoza in kri/krvne celice.
58. Poleg tega je treba razmisliti o študijah za preiskovanje serumskih označevalcev splošnih poškodb tkiva. Druge določitve, ki morajo biti izvedene, če obstaja možnost ali sum, da bodo znane lastnosti preskusne kemikalije vplivale na povezane metabolične profile, vključujejo kalcij, fosfat, trigliceride na tešče in glukozo na tešče, posebne hormone, methemoglobin in holinesterazo. Te je treba opredeliti za vsak primer posebej.
59. Na spremenljivost in absolutne koncentracije pri določanju hormonov lahko vplivajo naslednji dejavniki:
- čas usmrtnitve zaradi spreminjanja koncentracij hormonov preko dneva;
 - način usmrtnitve, da se prepreči nepotreben stres pri živalih, ki lahko vpliva na koncentracije hormonov;
 - preskusni kompleti, ki se uporabljajo za določanje hormonov in se lahko razlikujejo po standardnih krivuljah.
60. Vzorce plazme, ki so predvideni posebej za določanje hormonov, je treba odvzeti ob primerljivih urah dneva. Številčne vrednosti, pridobljene pri analiziranju koncentracij hormonov, so pri različnih kompletih za analize, ki so na voljo na trgu, različne.
61. Če pretekli izhodiščni podatki niso ustrezni, je treba razmisliti o določitvi hematoloških in kliničnih biokemičnih spremenljivk pred začetkom dajanja odmerkov ali po možnosti pri sklopu živali, ki niso vključene v preskusne skupine. Za samice je treba podatke pridobiti od doječih živali.

PATOLOGIJA

Makroskopska obdukcija

62. Na vseh odraslih živalih iz študije je treba opraviti popolno in natančno makroskopsko obdukcijo, ki obsega natančen pregled zunanje površine telesa, vseh odprtih, lobanjske, prsne in trebušne votline ter njihove vsebine. Posebno pozornost je treba posvetiti organom reproduktivnega sistema. Evidentirati je treba število ugnездitev. Vaginalne brise je treba pregledati na dan obdukcije, da se ugotovi faza pojatvenega ciklusa in omogoči korelacija s histopatološkimi preiskavami reproduktivnih organov samic.
63. Z mod, nadmodkov ter prostate in semenskih mešičkov s koagulacijskimi žlezami kot celote je treba pri vseh odraslih samcih, kot je ustrezno, odstraniti vsa priraščena tkiva in nato čim prej po disekciji izmeriti njihovo mokro težo, da se ne izsušijo. Poleg tega lahko teža neobveznih organov vključuje sistem mišice *levator ani* z bulbokavernozno mišico, Cowperjevi žlezi in glavico penisa pri samcih ter oba jajčnika (mokra teža) in maternico (vključno z materničnim vratom) pri samicah; če se navedeno vključi, je treba te teže zbrati čim prej po disekciji. Pri vseh odraslih živalih je treba shraniti jajčnike, moda, nadmodke, pomožne spolne organe in vse organe, na katerih se kažejo makroskopske lezije.
64. Ščitnične žleze vseh odraslih samcev in samic ter enega mladega samca in samice, starih 13 dni, iz vsakega legla je treba shraniti v fiksacijskem sredstvu, ki je najprimernejše za predvidene nadaljnje histopatološke preiskave. Teža ščitnice se lahko določi po fiksaciji. Pri odstranjevanju priraščenih tkiv je prav tako potrebna velika previdnost, opravi pa se lahko šele po fiksaciji, da se preprečijo poškodbe tkiv, ki lahko ogrozijo histopatološko analizo. Vzorce krvi je treba odvzeti na imenovanem mestu neposredno pred postopkom evtanazije živali ali med njim in jih hraniti v ustreznih pogojih (glej odstavke 56).
65. Poleg tega je treba vsaj petim odraslim samcem in samicam, naključno izbranim iz vsake skupine (to ne velja za živali, ki so najdene poginjavajoče in/ali so evtanazirane pred koncem študije), z jeter, ledvic, nadledvičnih žlez, priželjca, vranice, možganov in srca, kot je ustrezno, odstraniti vsa priraščena tkiva, nato pa čim prej po disekciji določiti njihovo mokro težo, da se ne izsušijo. Naslednja tkiva je treba shraniti v fiksacijskem sredstvu, ki je najprimernejše za vrsto tkiva in predvideno poznejšo histopatološko preiskavo: vse vidne lezije, možgane (reprezentativne regije, vključno z velikimi in malimi možgani ter mostom), hrbtenjačo, oko, želodec, tanko in debelo črevo (vključno s Peyerjevimi ploščami), jetra, ledvice, nadledvične žleze, vranico, srce, priželjc, sapnik in pljuča (shranijo se tako, da se napihnejo s fiksativom in nato potopijo), spolne žleze (moda in jajčnike), pomožne spolne organe (maternico in vrat, nadmodek, prostato in semenske mešičke s koagulacijskimi žlezami), vagino, sečni mehur, bezgavke (poleg najbližje drenažne bezgavke je treba vzeti še eno bezgavko v skladu z izkušnjami laboratorija (16)), periferni živec (ishiadčni ali tibialni), po možnosti v neposredni bližini mišice, skeletno mišico in kost s kostnim

mozgom (rezina ali sveže prepariran punktati kostnega mozga). Priporočljivo je, da se moda fiksirajo s potopitvijo v Bouinov ali prilagojen Davidsonov fiksativ (16) (17) (18); fiksacija v formalinu za ta tkiva ni priporočljiva. Tunico albugineo je dovoljeno nežno in plitvo punktirati na obeh polih organa z iglo, da lahko fiksativ hitro prodre v tkivo. Na podlagi kliničnih in drugih izsledkov se lahko pokaže potreba po preiskavah dodatnih tkiv. Poleg tega je treba shraniti vse organe, ki bi lahko bili ciljni organi glede na znane lastnosti preskusne kemikalije.

66. Z naslednjimi tkivi je mogoče pridobiti koristne informacije o endokrinih učinkih: spolnimi žlezami (jajčniki in modi), pomožnimi spolnimi organi (maternico, vključno z materničnim vratom, nadmodkom, semenskimi mešički s koagulacijskimi žlezami ter dorzolateralno in ventralno prostato), vagino, hipofizo, mlečno žlezo samcev in nadledvično žlezo. Spremembe v mlečnih žlezah samcev niso bile zadostno dokumentirane, vendar je lahko ta parameter zelo občutljiv za snovi z estrogenim delovanjem. Opazovanje organov/tkiv, ki niso navedeni v odstavku 65, je neobvezno.
67. Pri poginulih mladičih in mladičih, usmrčenih 13. dan po porodu ali kmalu zatem, je treba skrbno pregledati vsaj zunanost, da se odkrijejo večje nepravilnosti. Posebno pozornost je treba posvetiti zunanjim reproduktivnim genitalijam, pri katerih je treba pregledati, ali so se pojavili znaki spremenjenega razvoja.

Histopatologija

68. V celoti je treba opraviti histopatološke preiskave shranjenih organov in tkiv izbranih živali iz kontrolne skupine in skupine z velikim odmerkom (s posebnim poudarkom na fazah spermatogeneze v spolnih žlezah samcev in histopatologiji intersticijske celične strukture mod). Ščitnične žleze mladičev in preostalih odraslih živali se lahko pregledajo po potrebi. Te preiskave je treba razširiti na živali iz skupin, tretiranih z drugimi odmerjanji, če se v skupini, tretirani z velikim odmerkom, opazijo spremembe, povezane s tretiranjem. Več informacij o disekciji, fiksaciji, sekciji in histopatologiji endokrinih tkiv je na voljo v napotkih za histopatologijo (10).
69. Pregledati je treba vse vidne lezije. Da se lažje pojasnijo vrednosti brez opaznih škodljivih učinkov, je treba pregledati ciljne organe v skupinah z drugimi odmerki, zlasti v skupinah, v katerih naj ne bi bili opaženi škodljivi učinki.
70. Če se uporablja satelitska skupina, je treba opraviti histopatološko preiskavo na tkivih in organih, na katerih so bili opaženi učinki v tretiranih skupinah.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

71. Podatke je treba navesti za vsako žival posebej. Poleg tega je treba vse podatke povzeti v obliki preglednice, ki za vsako preskusno skupino prikazuje število živali na začetku preskusa, število živali, poginulih med preskusom ali evtanaziranih iz humanih razlogov, čas pogina ali evtanazije, število plodnih živali, število brejih samic, število živali, ki kažejo znake toksičnosti, opis znakov zaznane toksičnosti, vključno s časom začetka, trajanjem in resnostjo morebitnih toksičnih učinkov, vrsto histopatoloških sprememb in vse ustrezne podatke o leglu. Format zbirnega poročila v obliki preglednice, ki se je izkazal kot zelo koristen za oceno učinkov na razmnoževanje/razvoj, je naveden v Dodatku 3.
72. Če je mogoče, je treba številčne rezultate ocenjevati na podlagi primerne in splošno priznane statistične metode. Pri primerjavih učinka vzdolž odmernega območja se je treba izogibati večkratnim preskusom t. Statistične metode je treba izbrati med zasnovo študije. Statistična analiza zadnjično-genitalne razdalje in razvitosti prsnih bradavic mora temeljiti na podatkih za posameznega mladiča, pri čemer se upoštevajo učinki legla. Kadar je ustrezno, je enota analize leglo. Statistična analiza telesne teže mladičev mora temeljiti na podatkih za posameznega mladiča, pri čemer se upošteva velikost legla. Zaradi omejenega obsega študije imajo statistične analize v obliki preskusov „pomembnosti“ omejeno vrednost za številne končne točke, zlasti končne točke razmnoževanja. Nekatere najpogostejše uporabljene metode, zlasti parametrični testi za meritve centralne tendence, niso ustrezne. Če se uporabijo statistične analize, mora biti izbrana metoda ustrezna za porazdelitev preučevane spremenljivke, izbrati pa jo je treba pred začetkom študije.

Vrednotenje rezultatov

73. Ugotovitve te toksikološke študije je treba ovrednotiti glede na opažene učinke, obdukcijo in mikroskopske ugotovitve. Vrednotenje vključuje razmerje med odmerkom preskusne kemikalije in navzočnostjo ali odsotnostjo pojava in resnosti anomalij, vključno z makroskopskimi lezijami, ugotovljenimi ciljnim organi, neplodnostjo, kliničnimi anomalijami, prizadeto zmogljivostjo reproduktivnosti in legla, spremembami telesne mase, učinki na smrtnost in drugimi toksičnimi učinki.
74. Zaradi kratkotrajnega tretiranja samca je treba pri vrednotenju učinkov na razmnoževanje pri samcih histopatologijo mod in nadmodkov obravnavati skupaj s podatki o plodnosti. Kot pomoč pri razlagi študije je lahko koristna tudi uporaba podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov glede razmnoževanja/razvoja (npr. za velikost legla, zadnjično-genitalno razdaljo, razvitost prsnih bradavic, ravni T4 v serumu), če so na voljo.
75. Za kontrolo kakovosti se predlagata zbiranje podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov in izračun koeficientov variacije za številčne podatke, zlasti za parametre, povezane z zaznavanjem endokrinih motilcev. Ti podatki se lahko uporabijo za primerjave, ko se vrednotijo dejanske študije.

Poročilo o preskusu

76. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija:

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana.

Snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Vehikel (po potrebi):

- utemeljitev izbire vehikla, če to ni voda.

Preskusne živali:

- uporabljena vrsta/sev;
- število, starost in spol živali;
- izvor, nastanitvene razmere, prehrana itd.;
- teža posamezne živali na začetku preskusa.

- utemeljitev vrste, če to ni podgana.

Preskusni pogoji:

- utemeljitev izbire velikosti odmerkov;
- podrobni podatki o formulaciji preskusne kemikalije in pripravi hrane, doseženi koncentraciji, stabilnosti in homogenosti pripravka;
- podrobnosti o dajanju preskusne kemikalije;
- preračunavanje koncentracije preskusne kemikalije v hrani ali vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne teže/dan), če je ustrezno;
- podrobnosti o kakovosti hrane in vode;
- podroben opis postopka naključnega izbiranja mladičev za izločitev, če se izločijo.

Rezultati:

- telesna teža/spremembe telesne teže;
- poraba hrane, in če je ustrezno, poraba vode;
- podatki o toksičnem odzivu po spolu in odmerku, vključno s plodnostjo, brejostjo in drugimi znaki
- toksičnosti;
- trajanje brejosti; toksični ali drugi učinki na razmnoževanje, potomce, poporodno rast itd.;
- vrsta, resnost in trajanje kliničnih opažanj (s podatki o popravljivosti);
- ocene senzorične aktivnosti, moči oprijema in motorične aktivnosti;
- hematološki preskusi z ustreznimi referenčnimi vrednostmi;
- klinični biokemijski preskusi z ustreznimi referenčnimi vrednostmi;
- število odraslih samic z normalnim ali nenormalnim pojavačnim ciklusom in trajanje ciklusa;
- število živorojenih in izgub po ugnežditvi;
- število mladičev z večjimi vidnimi anomalijami; splošna ocena zunanjih genitalij, število spačkov;
- čas pogina med študijo oziroma ali so živali preživele do zaključka študije;

- število ugnezditev, velikost legla in teže legla ob evidentiranju;
- podatki o telesni teži mladičev;
- zadnjično-genitalna razdalja vseh mladičev (in telesna teža na dan meritve zadnjično-genitalne razdalje);
- razvitost prsnih bradavic pri mladih samcih;
- ravni ščitničnega hormona, mladiči, stari 13 dni, in odrasli samci (ter matere in mladiči, stari 4 dni, če se merijo);
- telesna teža ob usmrtnitvi in podatki o teži organov za starševske živali;
- izsledki obdukcije;
- podroben opis ugotovitev histopatoloških preiskav;
- podatki o absorpciji (če so na voljo);
- statistična obdelava rezultatov, če je to primerno.

Obravnavanje rezultatov.

Sklepne ugotovitve.

Razlaga rezultatov

77. S študijo bo zagotovljeno vrednotenje toksičnosti za razmnoževanje/razvoj, povezane z dajanjem ponovljenih odmerkov. Zlasti ker je poudarek tako na splošni toksičnosti kot na toksičnosti za razmnoževanje/razvoj končnih točk, rezultati študije omogočajo razlikovanje med učinki na razmnoževanje/razvoj, ki se pojavijo v odsotnosti splošne toksičnosti, in učinki, ki so izraženi samo na stopnjah, ki so toksične tudi za starše (glej odstavke 7–11). Pokazala bi lahko potrebo po dodatnih preiskavah in zagotovila smernice za zasnovo poznejših študij. Za pomoč pri razlagi rezultatov o razmnoževanju in razvoju glej Smernico OECD 43 (19). Smernica OECD 106 o histološkem vrednotenju preskusov endokrinega in razmnoževalnega sistema pri glodavcih (16) zagotavlja informacije o pripravi in ocenjevanju (endokrinih) organov in vaginalnih brisov, ki so lahko koristne za to preskusno metodo.

VIRI

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

- (5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10.–11. marec 1998, na voljo na zahtevo pri Organizaciji za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 217), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 19.), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (8) Goldman, J. M., Murr, A. S., Buckalew, A. R., Ferrell, J. M., in Cooper, R. L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, del B, 80 (2), 84–97.
- (9) Sadleir, R. M. F. S. (1979). Cycles and Seasons, v: Auston, C. R., in Short, R. V. (ur.). *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria. Environmental Health Criteria Document (št. 60).
- (11) Moser, V. C., McDaniel, K. M., in Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267–283.
- (12) Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., in Riley, M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233–236.
- (13) Crofton, K. M., Howard, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reiter, L. W., Tilson, H. A., MacPhail, R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 599–609.
- (14) Gallavan, R. H., Jr., Holson, J. F., Stump, D. G., Knapp, J. F., in Reynolds, V. L. (1999). 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology*, 13: 383–390.
- (15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 151). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 106), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (17) Hess, R. A., in Moore, B. J. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. V: *Methods in Reproductive Toxicology*, Chapin, R. E., in Heindel, J. J. (ur.). Academic Press: San Diego, Kalifornija, str. 52–85.
- (18) Latendresse, J. R., Warbritton, A. R., Jonassen, H., in Creasy, D. M. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524–533.
- (19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 43), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (20) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV (GLEJ TUDI (20) SMERNICO OECD 150)

Androgenost je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni androgeni hormon (npr. testosteron) v sesalskem organizmu.

Antiandrogenost je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega androgenega hormona (npr. testosterona) v sesalskem organizmu.

Antiestrogenost je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega estrogenega hormona (npr. 17 β -estradiola) v sesalskem organizmu.

Protiščitnično delovanje je zmožnost kemikalije, da zavira delovanje naravnega ščitničnega hormona (npr. T₃) v sesalskem organizmu.

Kemikalija je snov ali zmes.

Toksičnost za razvoj je pojavna oblika toksičnosti za razmnoževanje, ki se pri potomcih kaže kot pred-, ob- in poporodna strukturna ali funkcionalna motnja.

Odmerek je količina dane preskusne kemikalije. Izražen je kot masa preskusne kemikalije na enoto telesne teže preskusne živali na dan (npr. mg/kg telesne teže/dan) ali kot konstantna koncentracija v hrani.

Odmerjanje je splošen izraz, ki vključuje odmerek ter pogostnost in trajanje dajanja odmerka.

Očitna toksičnost je splošen izraz, ki opisuje jasne znake toksičnosti po dajanju preskusne kemikalije. Ti morajo zado-
stovati za oceno nevarnosti in biti takšni, da bi povečanje danega odmerka najverjetneje povzročilo razvoj resnih znakov toksičnosti in verjetno smrt.

Poškodbe plodnosti pomenijo motnje razmnoževalnih funkcij ali zmogljivosti pri samcih ali samicah.

Toksičnost pri materi škodljivi učinki na breje samice, ki se pojavijo bodisi specifično (neposredni učinek) bodisi nespecifično (posredni učinek) in so povezani z brejostjo.

NOAEL je kratica za raven brez opaženih škodljivih učinkov (no-observed-adverse-effect level). To je največji odmerek, pri katerem ni opaženih škodljivih učinkov zaradi tretiranja.

Estrogenost je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni estrogeni hormon (npr. 17 β -estradiola) v sesalskem organizmu.

Toksičnost za razmnoževanje pomeni škodljive učinke na potomstvo in/ali poškodbe razmnoževalnih funkcij ali zmogljivosti pri samcih in samicah.

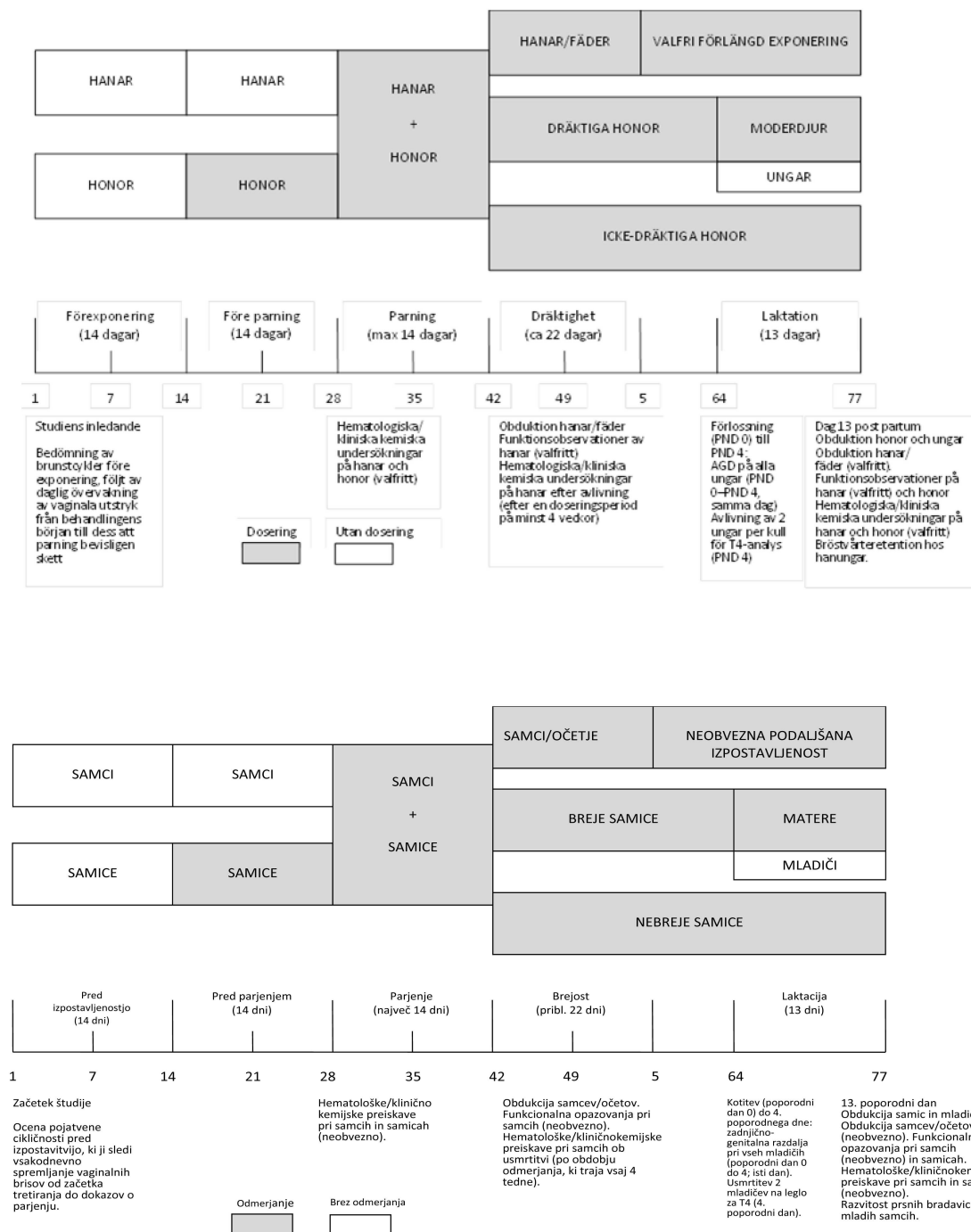
Preskusna kemikalija je vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Ščitnično delovanje je zmožnost kemikalije, da deluje tako kot naravni ščitnični hormon (npr. T_3) v sesalskem organizmu.

Validacija je znanstveni postopek, oblikovan za določanje zahtev glede delovanja in omejitev preskusne metode ter za prikaz njene zanesljivosti in ustreznosti za določen namen.

Dodatek 2

DIAGRAM NAČRTA POSKUSA Z NAVEDBO NAJDALJŠEGA TRAJANJA ŠTUDIJE NA PODLAGI POLNEGA 14-DNEVNEGA OBDOBJA PARJENJA



Dodatek 3

ZBIRNO POROČILO O UČINKIH NA RAZMNOŽEVANJE/RAZVOJ V OBLIKI PREGLEDNICE

OPAŽANJA	VREDNOSTI				
	0 (kontrola)	...	...	...	...
Odmerjanje (enote).....					
Začetni pari (N)					
Ciklus estrusa (vsaj srednja dolžina in pogostnost nerednih ciklusov)					
Samice, ki kažejo znake kopulacije (N)					
Samice, ki so dosegle brejost (N)					
Dnevi spočetja 1–5 (N)					
Dnevi spočetja 6–... ⁽¹⁾ (N)					
Brejost ≤ 21 dni (N)					
Brejost = 22 dni (N)					
Brejost ≥ 23 dni (N)					
Matere z živimi novorojenimi mladiči (N)					
Matere z živimi mladiči 4. dan po porodu (N)					
Ugnezditev/mati (srednja vrednost)					
Živi mladiči/mati ob rojstvu (srednja vrednost)					
Živi mladiči/mati 4. dan (srednja vrednost)					
Razmerje med spoloma (m/ž) ob rojstvu (srednja vrednost)					
Razmerje med spoloma (m/ž) 4. dan (srednja vrednost)					
Teža legla ob rojstvu (srednja vrednost)					
Teža legla 4. dan (srednja vrednost)					
Teža mladičev ob rojstvu (srednja vrednost)					
Teža mladičev ob meritvi zadnjično-genitalne razdalje (srednja vrednost pri samcih, srednja vrednost pri samicah)					
Zadnjično-genitalna razdalja pri mladičih na isti dan po porodu, od rojstva do 4. dne (srednja vrednost pri samcih, srednja vrednost pri samicah, označi dan po porodu)					

OPAŽANJA	VREDNOSTI				
Teža mladičev 4. dan (srednja vrednost)					
Teža mladičev 13. dan (srednja vrednost)					
Razvitost prsnih bradavic pri mladih samcih 13. dan (srednja vrednost)					

MLADIČI Z ANOMALIJAMI

Matere z 0					
Matere z 1					
Matere z ≥ 2					

IZGUBA POTOMSTVA**Predporodna (ugnezditve minus živorojeni)**

Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice z ≥ 3					

Poporodna (živorojeni minus živi 13. dan po porodu)

Samice z 0					
Samice z 1					
Samice z 2					
Samice z ≥ 3					

(1) zadnji dan obdobja parjenja

B.65 IN VITRO PRESKUSNA METODA MEMBRANSKE PREGRADE V ZVEZI Z JEDKOSTJO ZA KOŽO

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 435 (2015). Jedkost za kožo pomeni nastanek nepopravljive poškodbe kože, ki se kaže kot vidno odmiranje prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) (1). Ta preskusna metoda, enakovredna posodobljeni Smernici OECD za preskušanje 435, določa *in vitro* preskusno metodo membranske pregrade, ki se lahko uporabi za opredelitev jedkih kemikalij. Pri tej preskusni metodi se uporablja umetna membrana, zasnovana tako, da se na jedke kemikalije odzove podobno kot živalska koža *in situ*.
2. Jedkost za kožo se tradicionalno ocenjuje tako, da se preskusna kemikalija nanese na kožo živih živali, po določenem času pa se oceni obseg poškodb tkiva (2). Poleg te preskusne metode je bilo še več drugih preskusnih metod *in vitro* sprejetih kot alternative (3) (4) standardnemu postopku *in vivo* na koži kuncev (poglavje B.4 te priloge, enakovredno Smernici OECD za preskušanje 404), ki se uporablja za opredelitev jedkih kemikalij (2). V večstopenjski strategiji preskušanja in vrednotenja GHS ZN za oceno in razvrstitev jedkosti za kožo ter smernici OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi z draženjem kože/jedkostjo za kožo se priporoča uporaba validiranih in sprejetih preskusnih metod *in vitro* v okviru modulov 3 in 4 (1) (5). S pristopi IATA se opisuje več modulov, v katerih so zbrani viri informacij in orodja za analizo, ter (i) zagotavljajo smernice o tem, kako obstoječe podatke, pridobljene s preskušanjem, in podatke, ki ne temeljijo na preskušanju, združiti in uporabiti pri ocenjevanju potenciala kemikalij za draženje kože in jedkost za kožo, (ii) predlagan pa je tudi pristop, kadar je potrebno dodatno preskušanje, med drugim kadar so dobljeni negativni rezultati (5). Pri tem modularnem pristopu se lahko pozitivni rezultati iz preskusnih metod *in vitro* uporabijo za razvrstitev kemikalije kot jedke, ne da bi bilo potrebno preskušanje na živalih, s čimer se zmanjša in izpopolni uporaba živali ter preprečita bolečina in trpljenje, ki ju lahko povzroči uporaba živali za ta namen.
3. Validacijske študije so bile dokončane za model membranske pregrade *in vitro*, ki je na trgu na voljo kot Corrositex® (6) (7) (8) ter za podatkovno zbirko 163 snovi in zmesi kaže 79-odstotno splošno točnost pri napovedi jedkosti za kožo (128/163), 85-odstotno splošno točnost pri občutljivosti (76/89) in 70-odstotno splošno točnost pri specifičnosti (52/74) (7). Na podlagi njene priznane veljavnosti se je uporaba te validirane referenčne metode (VRM) priporočala v okviru večstopenjske strategije preskušanja za oceno potenciala nevarnosti kemikalij v zvezi z jedkostjo za kožo (5) (7). Preden se omogoči uporaba modela membranske pregrade *in vitro* v zvezi z jedkostjo za kožo za regulativne namene, je treba določiti njegovo zanesljivost, ustreznost (točnost) in omejitve, kar zadeva predlagano uporabo, da se zagotovi njegova primerljivost z VRM (9) v skladu s predhodno določenimi standardi izvajanja (10). Medsebojno priznavanje podatkov OECD bo zagotovljeno šele, ko bo predlagana nova ali posodobljena metoda v skladu s standardi izvajanja pregledana in vključena v enakovredno smernico OECD za preskušanje. Trenutno je s Smernico OECD za preskušanje 435 in to preskusno metodo zajeta samo ena metoda *in vitro*, tj. model Corrositex®, ki je na voljo na trgu.
4. Druge preskusne metode za preskušanje jedkosti za kožo temeljijo na uporabi rekonstituirane človeške kože (Smernica OECD 431) (3) in izolirane kože podgan (Smernica OECD 430) (4). Ta smernica za preskušanje omogoča tudi razvrstitev jedkih kemikalij v tri podkategorije jedkosti po GHS ZN in tri skupine transportne embalaže ZN v zvezi z nevarnostjo za jedkost. Ta smernica za preskušanje je bila prvotno sprejeta leta 2006, leta 2015 pa je bila posodobljena zaradi sklicevanja na dokument s smernicami IATA in posodobitve seznama snovi za preverjanje usposobljenosti.

OPREDELITVE POJMOV

5. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

6. Preskus, opisan v tej preskusni metodi, omogoča opredelitev jedkih preskusnih kemikalij in njihovo razvrstitev v podkategorije v skladu z GHS ZN/uredbo CLP (preglednica 1). Poleg tega se lahko taka preskusna metoda uporabi za sprejemanje odločitev o jedkosti in nejedkosti določenih razredov kemikalij, npr. organskih in anorganskih kislin, kislinskih derivatov (2), in baz za namene preskušanja nekaterih oblik transporta (7)(11)(12). S to preskusno metodo je opisan splošen postopek, podoben validirani referenčni preskusni metodi (7). Čeprav ta preskusna metoda ne

(1) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

(2) 'Kislinski derivat' je nespecifično poimenovanje razreda in je na splošno opredeljen kot kemikalija, proizvedena iz kisline bodisi neposredno bodisi z modifikacijo ali delno substitucijo. Ta razred vključuje anhidride, halogenirane kisline, soli in druge vrste kemikalij.

zagotavlja ustreznih informacij o dražilnosti za kožo, je treba opozoriti, da se s preskusno metodo B.46 (enakovredno Smernici OECD za preskušanje 439) izrecno obravnava učinek dražilnosti za kožo *in vitro* na zdravje (13). Za popolno vrednotenje lokalnih učinkov na kožo po enkratni izpostavljenosti kože je treba uporabiti smernico OECD v zvezi s celostnimi pristopi k testiranju in ocenjevanju (IATA) (5).

Preglednica 1

Kategorija in podkategorije snovi, ki so jedke za kožo, po GHS ZN ⁽¹⁾

Kategorija jedkih snovi (kategorija 1) (za organe, ki ne uporabljajo podkategorij)	Podkategorije potencialnih jedkih snovi ⁽¹⁾ (za organe, ki uporabljajo podkategorije, vključno z uredbo CLP)	Jedko pri ≥ tretjini živali	
		Izpostavljenost	Opažanje
Jedka snov	Podkategorija jedkih snovi 1A	≤ 3 minute	≤ 1 ura
	Podkategorija jedkih snovi 1B	> 3 minute / ≤ 1 ura	≤ 14 dni
	Podkategorija jedkih snovi 1C	> 1 ura / ≤ 4 ure	≤ 14 dni

⁽¹⁾ Za EU se v uredbi CLP uporabljajo tri podkategorije jedkosti za kožo, in sicer 1A, 1B in 1C.

- Validirana referenčna metoda (7) je omejena s tem, da številne nejedke kemikalije in nekatere jedke kemikalije na podlagi rezultatov začetnega preskusa združljivosti morda niso primerne za preskušanje (glej odstavek 13). V vodi raztopljene kemikalije s pH v razponu od 4,5 do 8,5 pogosto niso primerne za preskušanje; vendar 85 % kemikalij, preskušanih v tem razponu pH, pri preskušanju na živalih ni bilo jedkih (7). Metoda membranske pregrade *in vitro* se lahko uporabi za preskušanje trdnih snovi (topnih ali netopnih v vodi), tekočih snovi (vodnih raztopin ali ne) in emulzij. Vendar preskusnih kemikalij, ki ne povzročijo zaznavne spremembe pri preskusu združljivosti (tj. spremembe barve v sistemu za zaznavanje kemikalij validirane referenčne preskusne metode), ni mogoče preskusiti z metodo membranske pregrade in jih je treba preskusiti z uporabo drugih preskusnih metod.

NAČELO PRESKUSA

- Preskusni sistem je sestavljen iz dveh delov: sintetične makromolekularne biološke pregrade in sistema za zaznavanje kemikalij; pri tej preskusni metodi se s sistemom za zaznavanje kemikalij odkrije poškodba membranske pregrade, ki je nastala zaradi jedke preskusne kemikalije po nanosu preskusne kemikalije na površino sintetične makromolekularne membranske pregrade (7) z domnevno enakimi mehanizmi jedkosti, kot delujejo na živi koži.
- Prehajanje skozi membransko pregrado (ali preboj) se lahko meri z različnimi postopki ali sistemi za zaznavanje kemikalij, vključno s spremembo barve barvila, ki je indikator pH, ali neke druge lastnosti raztopine indikatorja pod pregrado.
- Membransko pregrado je treba določiti kot veljavno, tj. ustrezno in zanesljivo za predvideno uporabo. To vključuje zagotovitev, da so različni pripravki skladni glede lastnosti pregrade, npr. sposobni zadržati nejedke snovi, da se lahko jedke lastnosti kemikalij razvrstijo v različne podkategorije jedkosti po GHS ZN (1). Dodeljena razvrstitev temelji na času, ki ga kemikalija potrebuje za prehod skozi membransko pregrado do raztopine indikatorja.

DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

- Pred redno uporabo metode membranske pregrade *in vitro*, ki je v skladu s to preskusno metodo, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da pravilno razvrstijo 12 snovi za preverjanje usposobljenosti, priporočenih v preglednici 2. Kadar snov s seznama ni na voljo ali če je to utemeljeno, se lahko uporabi druga snov, za katero so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo* in *in vitro* (npr. s seznama referenčnih kemikalij (10)), če se uporabijo enaka merila za izbor, kot so opisana v preglednici 1.

Preglednica 2

Snovi za preverjanje usposobljenosti ⁽¹⁾

Snov ⁽²⁾	Št. CAS	Kemijski razred	Podkategorija <i>in vivo</i> po GHS ZN ⁽³⁾	Podkategorija <i>in vitro</i> po GHS ZN ⁽³⁾
Borov trifluorid dihidrat	13319-75-0	anorganske kisline	1A	1A
Dušikova kislina	7697-37-2	anorganske kisline	1A	1A
Fosforjev pentaklorid	10026-13-8	prekursorji anorganskih kislin	1A	1A
Valerilklorid	638-29-9	kislinski kloridi	1B	1B
Natrijev hidroksid	1310-73-2	anorganske baze	1B	1B
1-(2-aminoetil) piperazin	140-31-8	alifatski amini	1B	1B
Benzensulfonil klorid	98-09-9	kislinski kloridi	1C	1C
N,N-dimetil benzilamin	103-83-3	anilini	1C	1C
Tetraetilenpentamin	112-57-2	alifatski amini	1C	1C
Evgenol	97-53-0	fenoli	NJ	NJ
Nonil akrilat	2664-55-3	akrilati/metakrilati	NJ	NJ
Natrijev bikarbonat	144-55-8	anorganske soli	NJ	NJ

⁽¹⁾ 12 zgoraj navedenih snovi vsebuje tri snovi iz vsake od treh podkategorij po GHS ZN za jedke snovi in tri nejedke snovi, na voljo so pri komercialnih dobaviteljih, podkategorija po GHS ZN pa temelji na rezultatih visokokakovostnega preskušanja *in vivo*. Te snovi so s seznama 40 referenčnih snovi, ki so vključene na najkrajši možni seznam kemikalij, opredeljenih za dokazovanje točnosti in zanesljivosti preskusnih metod, ki so strukturno in funkcionalno podobne validiranim referenčnim preskusnim metodam, in so bile izbrane izmed 163 referenčnih kemikalij, ki so se prvotno uporabljale za validacijo referenčne preskusne metode (Corrositex[®]) (7) (10) (14). Cilj tega izbirnega postopka je bil vključiti čim več kemikalij, ki: so predstavljale razpon odzivov jedkosti (npr. snovi, ki niso jedke; jedke snovi iz embalažnih skupin ZN I, II in III), ki jih je mogoče izmeriti ali napovedati z validirano referenčno metodo; so predstavljale kemijske razrede, uporabljene v validacijskih postopkih; imajo dobro opredeljene kemijske strukture; so dale obnovljive rezultate v validirani referenčni preskusni metodi; so dale dokončne rezultate pri referenčnem preskusu *in vivo*; so bile na voljo na trgu; niso bile povezane s previsokimi stroški odstranjevanja (14).

⁽²⁾ Snovi, preskušene nerazredčene ali z ≥ 90 -odstotno čistostjo.

⁽³⁾ Ustrezne embalažne skupine ZN so I, II in III za kategorije 1A, 1B oziroma 1C po GHS ZN. NJ: nejedka snov.

POSTOPEK

12. V naslednjih odstavkih so opisani elementi in postopki preskusne metode umetne membranske pregrade za oceno jedkosti (7) (15) na podlagi trenutne VRM, tj. metode Corrositex[®], ki je na voljo na trgu. Membranska pregrada ter raztopine za preverjanje združljivosti/indikatorje in kategorizacijo se lahko izdelajo, pripravijo ali dobijo na trgu, tako kot v primeru VRM Corrositex[®]. Na voljo je vzorčni protokol preskusne metode za validirano referenčno preskusno metodo (7). Preskušanje je treba izvesti pri sobni temperaturi (17–25 °C), elementi pa morajo izpolnjevati naslednje pogoje.

Preskus združljivosti preskusne kemikalije

13. Pred izvedbo preskusa membranske pregrade se izvede preskus združljivosti, da se ugotovi, ali je preskusna kemikalija s sistemom za zaznavanje kemikalij zaznavna. Če sistem za zaznavanje kemikalij ne zazna preskusne kemikalije, preskusna metoda membranske pregrade ni primerna za ocenjevanje morebitne jedkosti navedene preskusne kemikalije in je treba uporabiti drugo preskusno metodo. Pri sistemu za zaznavanje kemikalij in pogojih izpostavljenosti, ki se uporabljajo za preskus združljivosti, je treba upoštevati izpostavljenost pri poznejšem preskusu membranske pregrade.

Preskus kategorizacije preskusne kemikalije glede na časovno merilo

14. Če je to ustrezno za preskusno metodo, je treba na preskusni kemikaliji, ki je glede na preskus združljivosti primerna, opraviti preskus kategorizacije glede na časovno merilo, tj. presejalni preskus za razlikovanje med šibkimi ali močnimi kislinami ali bazami. Pri validirani referenčni preskusni metodi se na primer preskus kategorizacije glede na časovno merilo uporablja za ugotovitev, katerega od dveh časovnih meril bi bilo treba uporabiti glede na to, ali se zazna velika kislina ali alkalna rezerva. Za določitev jedkosti in podkategorije jedkosti za kožo po GHS ZN je treba uporabiti dva različna prebojna časa, odvisno od kisline ali alkalne rezerve preskusne kemikalije.

ELEMENTI PRESKUSNE METODE MEMBRANSKE PREGRADNE

Membranska pregrada

15. Membranska pregrada je sestavljena iz dveh delov: proteinskega makromolekularnega vodnega gela in prepustne podporne membrane. Proteinski gel mora biti neprepusten za tekoče in trdne snovi, vendar ga je mogoče korodirati in narediti prepustnega. Popolnoma zgrajeno membransko pregrado je treba hraniti pri vnaprej določenih pogojih, ki dokazano preprečujejo slabšanje gela, tj. sušenje, rast mikrobov, dvigovanje in pokanje, zaradi katerega bi se poslabšala njegova učinkovitost. Določiti je treba sprejemljivo obdobje shranjevanja, po poteku katerega se pripravki membranske pregrade ne smejo uporabljati.
16. Prepustna podporna membrana zagotavlja mehansko podporo proteinskemu gelu med postopkom želiranja in izpostavljenostjo preskusni kemikaliji. Preprečevati mora pogrezanje in dvigovanje gela ter biti takoj prepustna za vse preskusne kemikalije.
17. Proteinski gel, ki ga sestavlja protein, npr. keratin, kolagen, ali zmes proteinov, ki tvorijo gelasti matriks, se uporablja kot ciljna snov za preskusno kemikalijo. Proteinski material se nanese na površino podporne membrane in pusti želirati, preden se membranska pregrada namesti nad raztopino indikatorja. Proteinski gel mora biti enakomerno debel in gost, brez zračnih mehurčkov ali nepravilnosti, ki bi lahko vplivale na njegovo funkcionalno celovitost.

Sistem za zaznavanje kemikalij

18. Raztopina indikatorja, ki je enaka raztopini, uporabljeni za preskus združljivosti, mora reagirati na prisotnost preskusne kemikalije. Uporabiti je treba barvilo, ki je indikator pH, ali kombinacijo barvil, npr. krezol rdeče in metil oranžno, ki na prisotnost preskusne kemikalije reagirajo s spremembo barve. Merilni sistem je lahko vizualni ali elektronski.
19. Pri sistemih za zaznavanje, razvitih za zaznavanje prehoda preskusne kemikalije skozi membransko pregrado, je treba oceniti njihovo ustreznost in zanesljivost, da se dokažejo razpon zaznavnih kemikalij in količinske omejitve zaznavanja.

IZVEDBA PRESKUSA

Namestitev elementov preskusne metode

20. Membranska pregrada se namesti v vialo (ali epruveto), v kateri je raztopina indikatorja, tako da je podporna membrana v celoti v stiku z raztopino indikatorja in ni zračnih mehurčkov. Paziti je treba, da pregrada ostane cela.

Nanašanje preskusne kemikalije

21. Primerna količina preskusne kemikalije, npr. 500 µl tekoče snovi ali 500 mg fino uprašene trdne snovi (7), se previdno nanese na zgornjo plast membranske pregrade in enakomerno porazdeli. Za vsako preskusno kemikalijo in njene ustrezne kontrole se pripravi ustrezno število ponovljenih vzorcev, npr. štiri (7) (glej odstavke od 23 do 25). Evidentira se čas nanosa preskusne kemikalije na membransko pregrado. Za zagotovitev, da so kratka obdobja jedkosti točno evidentirana, se preskusna kemikalija v vialo s ponovljenimi vzorci nanese postopoma.

Meritve prehajanja skozi membransko pregrado

22. Vsaka viala se ustrezno spremlja, evidentira se čas prve spremembe raztopine indikatorja, tj. prehoda skozi pregrado, in določi čas, ki je pretekel med nanosom in prehodom skozi membransko pregrado.

Kontrole

23. Pri preskusih, ki vključujejo uporabo vehikla ali topila s preskusno kemikalijo, mora biti vehikel ali topilo združljivo s sistemom membranske pregrade, tj. ne sme spreminjati celovitosti navedenega sistema ali jedkosti preskusne kemikalije. Kadar se uporabi, je treba kontrolo s topilom (ali vehiklom) preskusiti sočasno s preskusno kemikalijo, da se dokaže združljivost topila s sistemom membranske pregrade.
24. Pozitivno kontrolo (z jedko snovjo) s srednje jedkim delovanjem, npr. 110 ± 15 mg natrijevega hidroksida (podkategorija jedke snovi 1B po GHS ZN) (7), je treba preskusiti sočasno s preskusno kemikalijo, da se oceni, ali je delovanje preskusnega sistema sprejemljivo. Druga pozitivna kontrola, ki je iz istega kemijskega razreda kot preskusna kemikalija, je lahko koristna za oceno relativnega potenciala jedkosti jedke preskusne kemikalije. Izbrati je treba pozitivne kontrole s srednjo jedkostjo (npr. podkategorija 1B po GHS ZN), da se zaznajo spremembe v času prehajanja, ki je lahko nedopustno daljši ali krajši od določene referenčne vrednosti, kar lahko kaže, da preskusni sistem ne deluje pravilno. Za ta namen je uporabnost izredno jedkih (podkategorija 1A po GHS ZN) ali nejedkih kemikalij omejena. Z jedko kemikalijo iz podkategorije 1B po GHS ZN bi bilo mogoče zaznati prehiter ali prepočasen prebojni čas. Šibko jedka snov (podkategorija 1C po GHS ZN) bi se lahko uporabila kot pozitivna kontrola za merjenje zmožnosti preskusne metode, da dosledno razlikuje med šibko jedkimi in nejedkimi kemikalijami. Ne glede na uporabljeni pristop je treba sprejemljiv razpon odziva pozitivne kontrole razviti na podlagi razpona prebojnih časov iz preteklih preskusov za uporabljene pozitivne kontrole, kot je srednja vrednost $\pm 2-3$ standardni odkloni. Da se lahko zaznajo odkloni zunaj sprejemljivega razpona, je treba pri vsaki študiji določiti točen prebojni čas za pozitivno kontrolo.
25. Negativno (nejedko) kontrolo, npr. 10-odstotno citronsko kislino ali 6-odstotno propionsko kislino (7), je prav tako treba preskusiti sočasno s preskusno kemikalijo kot še en ukrep za kontrolo kakovosti, da se dokaže funkcionalna celovitost membranske pregrade.

Merila za sprejemljivost študije

26. V skladu z uveljavljenimi časovnimi parametri za vsako od podkategorij jedkosti po GHS ZN se čas (v minutah), ki preteče od nanosa preskusne kemikalije na membransko pregrado do prehoda skozi pregrado, uporabi za napoved jedkosti preskusne kemikalije. Da se študija šteje za sprejemljivo, morajo sočasne pozitivne kontrole dati pričakovani čas odziva na prehajanje (npr. prebojni čas 8–16 min za natrijev hidroksid, če se uporabi kot pozitivna kontrola), sočasna negativna kontrola ne sme biti jedka, sočasna kontrola s topilom, če se vključi, pa ne sme biti niti jedka niti ne sme spremeniti potenciala jedkosti preskusne kemikalije. Pred redno uporabo metode, ki izpolnjuje zahteve te preskusne metode, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da uporabijo 12 snovi, priporočenih v preglednici 2. Za nove podobne preskusne metode, razvite v okviru te preskusne metode, ki so strukturno in funkcionalno podobne validirani referenčni metodi (14), je treba pred začetkom uporabe nove metode kot predpisanega preskušanja uporabiti predhodno določene standarde izvajanja, da se dokažeta njena zanesljivost in točnost (10).

Razlaga rezultatov in razvrstitev preskusnih kemikalij glede na jedkost

27. Čas (v minutah), ki preteče od nanosa preskusne kemikalije na membransko pregrado do prehoda skozi pregrado, se uporabi za razvrstitev preskusne kemikalije v podkategorije jedkih snovi po GHS ZN (1) in po potrebi v embalažno skupino ZN (16). Mejne časovne vrednosti za vsako od treh podkategorij jedkih snovi so določene za vsako predlagano preskusno metodo. Pri končnih odločitvah o mejnih časih je treba upoštevati potrebo po zmanjšanju nevarnosti za razvrstitev jedke snovi v prenizko kategorijo (tj. lažno negativne rezultate). V tej smernici za preskušanje je treba uporabiti mejne čase modela Corrositex®, kot je opisan v preglednici 3, saj je to edina preskusna metoda, ki trenutno spada v okvir smernice za preskušanje (7).

Preglednica 3
Napovedni model Corrositex®

Povprečni prebojni čas (v min)		Napoved po GHS ZN ⁽³⁾
Preskusne kemikalije iz kategorije 1 ⁽¹⁾ (določene s preskusom kategorizacije, ki je del metode)	Preskusne kemikalije iz kategorije 2 ⁽²⁾ (določene s preskusom kategorizacije, ki je del metode)	
0–3 min	0–3 min	Jedka snov neobvezna podkategorija 1A
> 3 do 60 min	> 3 do 30 min	Jedka snov neobvezna podkategorija 1B
> 60 do 240 min	> 30 do 60 min	Jedka snov neobvezna podkategorija 1C
> 240 min	> 60 min	nejedka

⁽¹⁾ Preskusne kemikalije z veliko kislo/alkalno rezervo (6).

⁽²⁾ Preskusne kemikalije z majhno kislo/alkalno rezervo (6).

⁽³⁾ Podkategorije 1A, 1B in 1C po GHS ZN ustrezajo embalažnim skupinam ZN I, II oziroma III.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

28. Čas (v minutah), ki preteče od nanosa preskusne kemikalije in pozitivnih kontrol ter njihovega prehoda skozi pregrado, je treba prikazati v obliki preglednice kot posamezne podatke za ponovljene vzorce in srednjo vrednost $\pm$ standardni odklon za vsak poskus.

Poročilo o preskusu

29. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija in kontrolne snovi:

- Snov iz ene sestavine: kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.
- Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi: čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin;
- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- vir, številka serije, če je na voljo;
- obdelava preskusnih/kontrolnih kemikalij pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, drobljenje);
- stabilnost preskusne kemikalije, rok uporabe ali datum za ponovno analizo, če je znan;
- pogoji skladiščenja.

Vehikel:

- identifikacija, koncentracija (kjer je ustrezno), uporabljena količina;
- utemeljitev izbire vehikla.

Model membranske pregrade in vitro in uporabljeni protokol, vključno z dokazano točnostjo in zanesljivostjo.

Preskusni pogoji:

- opis uporabljene naprave in pripravljanih postopkov;
- vir in sestava uporabljene membranske pregrade *in vitro*;
- sestava in lastnosti raztopine indikatorja;
- metoda zaznavanja;
- količina preskusne kemikalije in kontrolne snovi;
- število ponovljenih vzorcev;
- opis in utemeljitev preskusa kategorizacije glede na časovno merilo;
- metoda nanosa;
- časi opazovanja;
- opis uporabljenih meril vrednotenja in razvrščanja;
- dokaz o usposobljenosti za izvajanje preskusne metode pred redno uporabo s preskušanjem kemikalij za preverjanje usposobljenosti.

Rezultati:

- preglednice z neobdelanimi podatki iz posameznih preskusnih in kontrolnih vzorcev za vsak ponovljeni vzorec;
- opisi drugih opaženih učinkov;
- izpeljana razvrstitev z navedbo uporabljenega napovednega modela/meril za odločitev.

*Razprava o rezultatih**Sklepne ugotovitve***VIRI**

- (1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS), peta revidirana izdaja, ZN New York in Ženeva, 2013. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Poglavje B.4 te priloge, Akutno draženje kože, jedkost za kožo.
- (3) Poglavje B.40a te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: preskusna metoda rekonstruirane človeške pokožnice.

- (4) Poglavje B.40 te priloge, Jedkost za kožo *in vitro*: transkutana električna upornost (TER).
- (5) OECD (2015). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 203). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (6) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhutter, H.-G., in Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicology In Vitro* 12, 483–524.
- (7) ICCVAM (1999). Corrositex[®]. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (št. 99-4495).
- (8) Gordon, V. C., Harvell, J. D., in Maibach, H. I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex[®] System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro Skin Toxicology-Irritation, Photo-toxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology* 10, 37–45.
- (9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment (št. 34).
- (10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.
- (11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX[®] Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italija. ATLA 29, 96–97.
- (12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (peti pregled). (20. september 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.
- (13) Poglavje B.46 te priloge, Draženje kože *in vitro*: preskusna metoda rekonstruirane človeške pokožnice. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication št. 04-4510. Na voljo na: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.
- (14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Na voljo na: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (15) Združeni narodi (ZN) (2013). Priporočila ZN o prevozu nevarnega blaga, Vzorčni predpisi, 18. revidirana izdaja (del, poglavje 2.8), ZN, 2013. Na voljo na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Dodatek

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (9).

Kemikalija: snov ali zmes.

Sistem za zaznavanje kemikalij: vizualni ali elektronski merilni sistem z raztopino indikatorja, ki na prisotnost preskusne kemikalije reagira na primer s spremembo barve barvila, ki je indikator pH, ali kombinacije barvil, ki na prisotnost preskusne kemikalije reagirajo s spremembo barve ali z drugimi vrstami kemijskih ali elektrokemijskih reakcij.

Skladnost: je merilo učinkovitosti za preskusne metode, s katerimi se pridobijo kategorični rezultati, in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz točnost se včasih uporabljata kot sopomenki in pomenita delež vseh preskušanih kemikalij, ki so pravilno razvrščene kot pozitivne ali negativne. Skladnost je zelo odvisna od razširjenosti pozitivnih rezultatov v vrstah preučevane preskusne kemikalije (9).

GHS (globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment (celostni pristop k testiranju in ocenjevanju).

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

NJ: nejedko.

Standardi izvajanja: standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi in so podlaga za oceno primerljivosti predlagane preskusne metode, ki je funkcijsko in mehanistično podobna. Vključujejo (i) nujne elemente preskusne metode; (ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (iii) podobne stopnje zanesljivosti in točnosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, ki jih mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (9).

Ustreznost: opis razmerja med preskusno metodo in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskusna metoda pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Ustreznost upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (9).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih (9).

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (9).

Jedkost za kožo in vivo: nastanek nepovračljivih poškodb kože: zlasti vidnega odmiranja prek povrhnjice v usnjico po nanosu preskusne kemikalije za največ 4 ure. Za reakcije jedkosti so značilne razjede, krvavitve, krvave hraste in do konca 14-dnevnega opazovanja izguba barve zaradi beljenja kože, celi predeli alopecije in brazgotine. Dvoumne lezije je morda treba preiskati histopatološko.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusno metodo pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (9).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

B.66 IN VITRO PRESKUSI TRANSAKTIVACIJE S STABILNO TRANSFEKCIJO ZA ZAZNAVO AGONISTOV IN ANTAGONISTOV ESTROGENSKIH RECEPTORJEV

SPLOŠNI UVOD

Smernica OECD za preskušanje na podlagi učinkovitosti

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 455 (2016). Smernica za preskušanje 455 temelji na učinkovitosti, z njo pa je opisana metodologija *in vitro* preskusov transaktivacije s stabilno transfekcijo za zaznavo agonistov in antagonistov estrogenskih receptorjev (v nadaljnjem besedilu: preskusi ER TA). Vključuje več mehanistično in funkcionalno podobnih preskusnih metod za opredelitev agonistov in antagonistov estrogenskih receptorjev (tj. ER α , in/ali ER β) ter naj bi olajšala razvoj novih podobnih ali prilagojenih preskusnih metod v skladu z načeli za validacijo, določenimi v Smernici OECD za validacijo in mednarodno priznanje novih ali posodobljenih preskusnih metod za oceno nevarnosti (1). Popolnoma validirani referenčni preskusni metodi (Dodatek 2 in Dodatek 3), ki sta podlaga za to smernico za preskušanje na podlagi učinkovitosti, sta:

— preskus transaktivacije s stabilno transfekcijo (STTA) (2) z uporabo celične linije (h) ER α -HeLa-9903 in

— preskus ER TA VM7Luc (3) z uporabo celične linije VM7Luc4E2 (1), ki večinoma izraža hER α z določenim prispevkom hER β (4) (5).

Za razvoj in validacijo podobnih preskusov za isto končno točko nevarnosti so na voljo standardi izvajanja (6) (7) in jih je tudi treba uporabiti. Omogočajo pravočasno spremembo na učinkovitosti temelječe Smernice za preskušanje 455, tako da je mogoče posodobljeni smernici za preskušanje, ki temelji na učinkovitosti, dodati nove podobne preskuse; podobni preskusi bodo sicer dodani šele, ko jih bo OECD pregledala in potrdila, da so v skladu s standardi izvajanja. Preskusi, vključeni v Smernico za preskušanje 455, se lahko brez razlik uporabljajo za obravnavanje zahtev držav OECD po rezultatih preskusov v zvezi s transaktivacijo estrogenskih receptorjev, hkrati pa se izkoristi medsebojno priznavanje podatkov OECD.

Ozadje in načela preskusov, vključenih v to preskusno metodo

2. OECD se je leta 1998 začela ukvarjati s prednostno nalogo revidiranja obstoječih smernic za preskušanje ter priprave novih smernic za presejalne preskuse in preskušanje kemikalij, ki bi lahko povzročale endokrine motnje. Temeljni okvir OECD za preskušanje in ocenjevanje kemikalij, ki bi lahko povzročale endokrine motnje, je bil revidiran leta 2012. Prvotni in revidirani temeljni okvir sta kot prilogi vključena v Smernice OECD za standardizirane smernice za preskušanje za ocenjevanje kemikalij glede lastnosti endokrinih motilcev (8). Temeljni okvir zajema pet ravni, pri čemer vsaka raven ustreza posamezni stopnji biološke kompleksnosti. Preskusi transaktivacije ER (TA), opisani v tej preskusni metodi, so raven 2, ki vključuje *preskuse in vitro, ki zagotavljajo podatke o izbranih endokrinih mehanizmih/poteh*. Ta preskusna metoda je za preskuse transaktivacije (TA) *in vitro*, s katerimi se opredelijo agonisti in antagonisti estrogenskih receptorjev (ER).
3. Interakcija med estrogeni in ER lahko vpliva na transkripcijo genov pod nadzorom estrogena, kar lahko povzroči indukcijo ali inhibicijo celičnih procesov, vključno s tistimi, ki so nujni za celično proliferacijo, normalen razvoj zarodka in razmnoževalno funkcijo (9) (10) (11). Motnja normalnih estrogenskih sistemov ima lahko škodljive učinke na normalen razvoj (ontogenezo), reproduktivno zdravje in celovitost razmnoževalnega sistema.
4. Preskusi TA *in vitro* temeljijo na neposredni ali posredni interakciji med snovmi in določenim receptorjem, ki uravnava transkripcijo produkta poročevalskega gena. Taki preskusi se obsežno uporabljajo za oceno izražanja genov, uravnavanega s posebnimi jedrnimi receptorji, kot so ER (12) (13) (14) (15) (16). Predlagani so bili za zaznavanje estrogenske transaktivacije, uravnavane z ER (17) (18) (19). Obstajata najmanj dve večji podvrsti jedrnih ER, tj. α in β , ki sta kodirani z različnimi geni. Zadevni proteini imajo različne biološke funkcije ter različne afinitete za porazdelitev v tkivu in vezavo ligandov (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Jedrni ER α povzročajo klasični estrogenski odziv (27) (28) (29) (30), zato je večina modelov, ki se trenutno razvijajo za merjenje aktivacije ali inhibicije ER, specifičnih za ER α . Preskusi se uporabljajo za opredelitev kemikalij, ki aktivirajo (ali zavirajo) ER po vezavi liganda, po kateri se kompleks receptor-ligand veže na specifične odzivne elemente DNK in transaktivira poročevalski gen, zaradi česar se poveča celično izražanje označevalnega proteina. Pri teh preskusih se lahko uporabljajo različni odzivi poročevalskega gena. V luciferaznih sistemih luciferazni encim pretvori substrat luciferin v bioluminiscenten produkt, ki ga je mogoče kvantitativno izmeriti z luminometrom. Drugi primeri pogostih poročevalskih genov so fluorescenčni

protein in gen *LacZ*, ki kodira β -galaktozidazo, tj. encim, ki lahko pretvori brezbarvni substrat X-gal (5-bromo-4-kloro-indolil-galaktopiranozid) v moder produkt, ki ga je mogoče kvantificirati s spektrofotometrom. Te poročevalske gene je mogoče hitro in poceni oceniti s preskusnimi kompleti, ki so na voljo na trgu.

5. Z validacijskimi študijami preskusov transaktivacije s stabilno transfekcijo (STTA) in VM7Luc TA sta bili dokazani njuna ustreznost in zanesljivost za predvideni namen (3) (4) (5) (30). Standardi izvajanja za preskuse ER TA, temelječe na luminiscenci, z uporabo celičnih linij dojk so vključeni v ocenjevalno poročilo ICCVAM o preskusni metodi LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): Preskus *in vitro* za opredelitev agonističnega in antagonističnega delovanja kemikalij na človeške estrogenske receptorje (3). Ti standardi izvajanja so bili prilagojeni tako, da se lahko uporabljajo za preskusa STTA in VM7Luc TA (2).
6. Opredelitve pojmov in kratice, uporabljene pri tej preskusni metodi, so opisane v Dodatku 1.

Obseg in omejitev v zvezi s preskusi TA

7. Ti preskusi so predlagani za namene presejanja in prednostnega razvrščanja, lahko pa zagotovijo tudi mehanistične podatke, ki se lahko uporabijo pri pristopu, temelječem na zanesljivosti dokazov. Z njimi se obravnava TA, povzročena z vezavo kemikalije na ER v sistemu *in vitro*. Tako se rezultati ne smejo neposredno ekstrapolirati na kompleksno signaliziranje in uravnavanje nedotaknjene endokrinega sistema *in vivo*.
8. TA, povzročena z ER, se šteje za enega od ključnih mehanizmov motenj endokrinega sistema, čeprav obstajajo še drugi mehanizmi, prek katerih lahko pride do takih motenj, vključno z (i) interakcijami z drugimi receptorji in encimskimi sistemi znotraj endokrinega sistema, (ii) sintezo hormonov, (iii) presnovno aktivacijo in/ali inaktivacijo hormonov, (iv) porazdelitvijo hormonov v tarčna tkiva in (v) očiščkom hormonov iz telesa. Ti načini delovanja se ne obravnavajo z nobenim od preskusov v okviru te preskusne metode.
9. S to preskusno metodo se obravnava sposobnost kemikalije, da aktivira (tj. deluje kot agonist) in tudi zavira (tj. deluje kot antagonist) od ER odvisno transkripcijo. Nekatere kemikalije lahko, odvisno od vrste celic, delujejo kot agonisti in antagonisti ter so poznane kot selektivni modulatorji estrogenih receptorjev (SERM). Kemikalije, ki so pri teh preskusih negativne, bi se lahko ocenile pri preskusu vezave na ER, preden se ugotovi, da se kemikalija ne veže na receptor. Poleg tega preskusi verjetno dajejo samo informacije o delovanju matične molekule, saj je treba upoštevati omejene presnovne zmogljivosti celičnih sistemov *in vitro*. Glede na to, da so se med validacijo uporabile samo posamezne snovi, uporaba za preskušanje zmesi ni bila obravnavana. Kljub temu je preskusna metoda teoretično ustrezna tudi za preskušanje snovi z več sestavinami, UVCB in zmesi. Preden se ta preskusna metoda uporabi za snov z več sestavinami, UVCB ali zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.
10. Informativno so v preglednici 1 navedeni rezultati preskusov agonistov za 34 snovi, ki so bile preskušene v obeh popolnoma validiranih referenčnih preskusnih metodah, opisanih v tej preskusni metodi. Od teh snovi jih je 26 razvrščenih med dokončne agoniste ER, 8 pa je negativnih na podlagi objavljenih poročil, vključno s preskusi *in vitro* za vezavo na ER in TA, in/ali uterotropnega preskusa (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). V preglednici 2 so navedeni rezultati preskusov antagonistov za 15 snovi, ki so bile preskušene v obeh popolnoma validiranih referenčnih preskusnih metodah, opisanih v tej preskusni metodi. Od teh snovi so 4 razvrščene med dokončne/domnevne antagoniste ER, 10 pa je negativnih na podlagi objavljenih poročil, vključno s preskusi *in vitro* za vezavo na ER in TA (2) (3) (18) (31). Glede podatkov, povzetih v preglednicah 1 in 2, je obstajalo 100-odstotno ujemanje med obema referenčnima preskusnima metodama v zvezi z razvrščanjem vseh snovi razen ene (Mifepristone) za preskus z antagonistom, vse snovi pa so bile pravilno razvrščene med agoniste/antagoniste ER ali negativne. Dodatne informacije o tej skupini kemikalij in dodatnih kemikalijah, preskušanih v preskusih STTA in VM7Luc ER TA med validacijskimi študijami, so na voljo v standardih izvajanja za ERTA (6) (7), Dodatek 2 (preglednice 1, 2 in 3).

Preglednica 1
Pregled rezultatov preskusov STTA in VM7Luc ER TA za snovi, prekušene pri obeh preskusih z agonistom in razvrščene med agoniste ER (POZ) ali negativne (NEG)

	Snov	Št. CAS	Preskus ⁽¹⁾ STTA			Preskus ⁽²⁾ VM7Luc ER TA		Vir podatkov za razvrstitev ⁽⁴⁾		
			Delovanje ER TA	Vrednost PC ₁₀ (M)	Vrednost PC ₅₀ ^(b) (M)	Delovanje ER TA	Vrednost EC ₅₀ ^(b) , ^(c) (M)	Drugi ER TA ^(c)	Vezava na ER	Uterotropno
1	17β-estradiol ^(a)	50-28-2	POZ	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	POZ	5,63 × 10 ⁻¹²	POZ (227/227)	POZ	POZ
2	17α-estradiol ^(a)	57-91-0	POZ	7,24 × 10 ⁻¹¹	6,44 × 10 ⁻¹⁰	POZ	1,40 × 10 ⁻⁹	POZ (11/11)	POZ	POZ
3	17α-ethinil estradiol ^(a)	57-63-6	POZ	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	< 1,00 × 10 ⁻¹¹	POZ	7,31 × 10 ⁻¹²	POZ (22/22)	POZ	POZ
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POZ	1,78 × 10 ⁻⁸	2,73 × 10 ⁻⁷	POZ	4,20 × 10 ⁻⁸	POZ (2/2)	NP	NP
5	19-nortestosteron ^(a)	434-22-0	POZ	9,64 × 10 ⁻⁹	2,71 × 10 ⁻⁷	POZ	1,80 × 10 ⁻⁶	POZ (4/4)	POZ	POZ
6	4-kumilfenol ^(a)	599-64-4	POZ	1,49 × 10 ⁻⁷	1,60 × 10 ⁻⁶	POZ	3,20 × 10 ⁻⁷	POZ (5/5)	POZ	NP
7	4-terc-oktilfenol ^(a)	140-66-9	POZ	1,85 × 10 ⁻⁹	7,37 × 10 ⁻⁸	POZ	3,19 × 10 ⁻⁸	POZ (21/24)	POZ	POZ
8	Apigenin ^(a)	520-36-5	POZ	1,31 × 10 ⁻⁷	5,71 × 10 ⁻⁷	POZ	1,60 × 10 ⁻⁶	POZ (26/26)	POZ	NP

	Šnov	Št. CAS	Preskus ⁽¹⁾ STTA			Preskus ⁽²⁾ VM7Luc ER TA		Vir podatkov za razvrstitev ⁽⁴⁾		
			Delovanje ER TA	Vrednost PC ₁₀ (M)	Vrednost PC ₅₀ (M)	Delovanje ER TA	Vrednost EC ₅₀ ^(b) , ⁽³⁾ (M)	Drugi ER TA ^(c)	Vezava na ER	Uterotropno
9	Atrazin ^(a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NP
10	Bisfenol A ^(a)	80-05-7	POZ	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	POZ	$5,33 \times 10^{-7}$	POZ (65/65)	POZ	POZ
11	Bisfenol B ^(a)	77-40-7	POZ	$2,36 \times 10^{-8}$	$2,11 \times 10^{-7}$	POZ	$1,95 \times 10^{-7}$	POZ (6/6)	POZ	POZ
12	Butilbenzil ftalat ^(a)	85-68-7	POZ	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POZ	$1,98 \times 10^{-6}$	POZ (12/14)	POZ	NEG
13	Kortikosteron ^(a)	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG (6/6)	NEG	NP
14	Kumestrol ^(a)	479-13-0	POZ	$1,23 \times 10^{-9}$	$2,00 \times 10^{-8}$	POZ	$1,32 \times 10^{-7}$	POZ (30/30)	POZ	NP
15	Daidzein ^(a)	486-66-8	POZ	$1,76 \times 10^{-8}$	$1,51 \times 10^{-7}$	POZ	$7,95 \times 10^{-7}$	POZ (39/39)	POZ	POZ
16	Dietilstilbestrol ^(a)	56-53-1	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	POZ	$3,34 \times 10^{-11}$	POZ (42/42)	POZ	NP
17	Di-n-butil ftalat	84-74-2	POZ	$4,09 \times 10^{-6}$	—	POZ	$4,09 \times 10^{-6}$	POZ (6/11)	POZ	NEG
18	Etil paraben	120-47-8	POZ	$5,00 \times 10^{-6}$	{brez PC ₅₀ }	POZ	$2,48 \times 10^{-5}$	POZ	—	NP
19	Estron ^(a)	53-16-7	POZ	$3,02 \times 10^{-11}$	$5,88 \times 10^{-10}$	POZ	$2,34 \times 10^{-10}$	POZ (26/28)	POZ	POZ
20	Genistein ^(a)	446-72-0	POZ	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	POZ	$2,71 \times 10^{-7}$	POZ (100/102)	POZ	POZ

	Snov	Št. CAS	Preskus ⁽¹⁾ STTA			Preskus ⁽²⁾ VM7Luc ER TA		Vir podatkov za razvrstitev ⁽⁴⁾		
			Delovanje ER TA	Vrednost PC ₁₀ (M)	Vrednost PC ₅₀ (M)	Delovanje ER TA	Vrednost EC ₅₀ ^(b) , ⁽³⁾ (M)	Drugi ER TA ^(c)	Vezava na ER	Uterotropno
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NP
22	Kampferol ^(a)	520-18-3	POZ	1,36 × 10 ⁻⁷	1,21 × 10 ⁻⁶	POZ	3,99 × 10 ⁻⁶	POZ (23/23)	POZ	NP
23	Kepon ^(a)	143-50-0	POZ	7,11 × 10 ⁻⁷	7,68 × 10 ⁻⁶	POZ	4,91 × 10 ⁻⁷	POZ (14/18)	POZ	NP
24	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NP
25	Linuron ^(a)	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NP
26	Mezo-heksestrol ^(a)	84-16-2	POZ	< 1,00 × 10 ⁻¹¹ ₁	2,75 × 10 ⁻¹¹	POZ	1,65 × 10 ⁻¹¹	POZ (4/4)	POZ	NP
27	Metiltestosteron ^(a)	58-18-4	POZ	1,73 × 10 ⁻⁷	4,11 × 10 ⁻⁶	POZ	2,68 × 10 ⁻⁶	POZ (5/6)	POZ	NP
28	Morin	480-16-0	POZ	5,43 × 10 ⁻⁷	4,16 × 10 ⁻⁶	POZ	2,37 × 10 ⁻⁶	POZ (2/2)	POZ	NP
29	Noretinodrel ^(a)	68-23-5	POZ	1,11 × 10 ⁻¹¹	1,50 × 10 ⁻⁹	POZ	9,39 × 10 ⁻¹⁰	POZ (5/5)	POZ	NP
30	P,p'-metoksiklor ^(a)	72-43-5	POZ	1,23 × 10 ⁻⁶	(brez PC ₅₀) ^(b)	POZ	1,92 × 10 ⁻⁶	POZ (24/27)	POZ	POZ
31	Fenobarbital ^(a)	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NP

	Snov	Št. CAS	Preskus ⁽¹⁾ STTA			Preskus ⁽²⁾ VM7Luc ER TA		Vir podatkov za razvrstitev ⁽⁴⁾		
			Delovanje ER TA	Vrednost PC ₁₀ (M)	Vrednost PC ₅₀ ^(b) (M)	Delovanje ER TA	Vrednost EC ₅₀ ^(b) , ⁽³⁾ (M)	Drugi ER TA ^(c)	Vezava na ER	Uterotropno
32	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NP
33	Spironolakton ⁽⁴⁾	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NP
34	Testosteron	58-22-0	POZ	$2,82 \times 10^{-8}$	$9,78 \times 10^{-6}$	POZ	$1,75 \times 10^{-5}$	POS (5/10)	POZ	NP

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); M = molarne; EC₅₀ = srednja efektivna koncentracija preskusne snovi; NEG = negativno; POZ = pozitivno; NP = ni preskušeno; PC₁₀ (in PC₅₀) = koncentracija preskusne snovi, pri kateri odziv znaša 10 % (ali 50 % za PC₅₀) odziva, ki ga na posamezni plošči povzroči pozitivni kontrolni vzorec (E2, 1 nm).

⁽⁴⁾ Običajne snovi, preskušene s preskusoma STTA in VM7Luc ER TA, ki so bile opredeljene kot agonisti ER ali negativne in so bile uporabljene za oceno točnosti pri validacijski študiji VM7Luc ER TA (ocenjevalno poročilo ICCVAM VM7Luc ER TA, preglednica 4-1 (3)).

^(b) Najvišja koncentracija, preiskovana brez omejitev zaradi citotoksičnosti ali netopnosti, je bila 1×10^{-5} M (preskus STTA) oziroma 1×10^{-3} M (preskus VM7Luc ER TA).

^(c) V oklepaju je navedeno število rezultatov preskusa, označenih za pozitivne (POZ) ali negativne (NEG), od skupnega števila zajetih študij.

⁽¹⁾ Vrednosti iz osnutka poročila o predhodni validaciji in medlaboratorijski validaciji preskusa transkripcijske aktivacije (TA) s stabilno transfekcijo za zaznavo estrogenskega delovanja – preskus z reporterskim genom, povzročenim s človeškim estrogenskim receptorjem alfa, z uporabo celične linije hER-HeLa-9903 (2).

⁽²⁾ Ocenjevalno poročilo ICCVAM o preskusni metodi LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): metoda in vitro za opredelitev agonistov in antagonistov ER (3).

⁽³⁾ Srednje vrednosti EC₅₀ so bile izračunane z vrednostmi, ki so jih sporočili laboratoriji iz validacijske študije VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM in Hiyoshi) (3).

⁽⁴⁾ Razvrstitev med agoniste ER ali negativne je temeljila na informacijah iz dokumentov ICCVAM o pregledu ozadja (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Opombe: Vsak preskus v okviru te preskusne metode nima enakih meritev. V nekaterih primerih EC₅₀ ni mogoče izračunati, ker ni dobljena celotna krivulja odziva na odmerke. Medtem ko je pri preskusu STTA vrednost PC₁₀ ključna meritev, so možni še drugi primeri, pri katerih PCx zagotovi koristne informacije.

Preglednica 2

Primerjava rezultatov preskusov STTA in VM7Luc ER TA za snovi, preskušene pri obeh preskusih z antagonistom in razvrščene med antagoniste ER (POZ) ali negativne (NEG)

	Snov ^(a)	Št. CAS	Preskus ER STTA ⁽¹⁾		Preskus VM7Luc ER TA ⁽²⁾		Učinki kandidatske snovi za ER STTA ⁽⁴⁾	Dogovorjena razvrstitev ⁽⁵⁾ ICCVAM	Kemijski razred MeSH ⁽⁶⁾	Skupina proizvajalcev ⁽⁷⁾
			Delovanje	ER TA Vrednost IC ₅₀ ^(b) (M)	Delovanje	ER TA Vrednost IC ₅₀ ^(b) , ^(c) (M)				
1	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	POZ	$3,97 \times 10^{-9}$	POZ	$2,08 \times 10^{-7}$	zmerno POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo
2	Dibenzo[a,h] antracen	53-70-3	POZ	Brez IC ₅₀	POZ	Brez IC ₅₀	POZ	DP	policiklična spojina	laboratorijska kemikalija, naravni produkt
3	Mifepriston	84371-65-3	POZ	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	—	Blago POZ	NEG	steroid	farmacevtsko sredstvo
4	Raloksifen HCl	82640-04-8	POZ	$7,86 \times 10^{-10}$	POZ	$1,19 \times 10^{-9}$	zmerno POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo
5	Tamoksifen	10540-29-1	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	POZ	$8,17 \times 10^{-7}$	POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo
6	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	DN	DN	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
7	Apigenin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	heterociklična spojina	Barvilo, naravni produkt, vmesni farmacevtski produkt

	Snov ⁽⁴⁾	Št. CAS	Preskus ER STTA ⁽¹⁾		Preskus VM7Luc ER TA ⁽²⁾		Učinki kandi- datne snovi za ER STTA ⁽⁴⁾	Dogovorjena razvrstitev ⁽⁵⁾ ICCVAM	Kemijski razred MeSH ⁽⁶⁾	Skupina proizvo- dov ⁽⁷⁾
			Delovanje	ER TA Vrednost IC ₅₀ ^(b) (M)	Delovanje	ER TA Vrednost IC ₅₀ ^(b) , ⁽³⁾ (M)				
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	DN	heterociklična spojina	herbicid
9	Di-n-butil ftalat	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	ester, ftalna kislina	kozmetična sestavina, indu- strijska kemi- kalija, mehčalo
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	ni preskušeno	DN	heterociklična spojina, pir- imidin	fungicid
11	Flavon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	DN	DN	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt, vmesni farma- cevski produkt
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	DN	amid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
13	Genistein	446-72-0	NEG	—	NEG	—	DN	NEG	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt, vmesni farma- cevski produkt
14	P-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	ni preskušeno	NEG	fenol	kemijski vmesni produkt

	Snov ⁽⁴⁾	Št. CAS	Preskus ER STTA ⁽¹⁾		Preskus VM7Luc ER TA ⁽²⁾		Učinki kandi- datne snovi za ER STTA ⁽⁴⁾	Dogovorjena razvrstitev ⁽²⁾ ICCVAM	Kemijski razred MeSH ⁽⁶⁾	Skupina proizvo- dov ⁽⁷⁾
			Delovanje	ER TA Vrednost IC ₅₀ ⁽⁶⁾ (M)	Delovanje	ER TA Vrednost IC ₅₀ ⁽⁶⁾ , ⁽³⁾ (M)				
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	DN	NEG	ogljikovodik (ciklični)	naravni produkt

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); M = molar; IC₅₀ = srednja inhibicijska koncentracija preskusne snovi; NEG = negativno; DN = domnevno negativno; POZ = pozitivno; DP = domnevno pozitivno.

⁽⁴⁾ Običajne snovi, preskušene s preskusoma STTA in VM7Luc ER TA, ki so bile označene kot antagonisti ER ali negativne in so bile uporabljene za oceno točnosti pri validacijski študiji VM7Luc ER TA (2) (3).

⁽⁶⁾ Najvišja koncentracija, preskušena brez omejitev zaradi citotoksičnosti ali netopnosti, je bila 1×10^{-3} M (preskus STTA) oziroma 1×10^{-5} M (preskus VM7Luc ER TA).

⁽¹⁾ Validacijsko poročilo o preskusu transkripcijske aktivacije s stabilno transfekcijo za zaznavo z ER povzročenega delovanja, del B (2).

⁽²⁾ Ocenjevalno poročilo ICCVAM o preskusni metodi LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): metoda in vitro za opredelitev agonistov in antagonistov ER (3).

⁽³⁾ Srednje vrednosti IC₅₀ so bile izračunane z vrednostmi, ki so jih sporočili laboratoriji iz validacijske študije VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM in Hiyoshi) (3).

⁽⁴⁾ Delovanje ER STTA, o katerem se je sklepalo na podlagi sporočenih učinkov, poznanih iz podatkov centra CERi o preteklih preskusih receptorske vezave ER, uterotropnega preskusa in informacij, zbranih iz javno dostopnih virov (2).

⁽⁵⁾ Razvrstitev med antagoniste ER ali negativne je temeljila na informacijah iz dokumenta ICCVAM o pregledu ozadja preskusov vezave ER in TA (31) ter informacijah, pridobljenih iz objav, ki so bile objavljene in pregledane po dokončanju dokumentov ICCVAM o pregledu ozadja (2) (3) (18) (31).

⁽⁶⁾ Snovi so bile razvrščene v enega ali več kemijskih razredov z uporabo mednarodno priznanega standardiziranega sistema za razvrščanje, U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (na voljo na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽⁷⁾ Snovi so bile razvrščene v enega ali več razredov izdelkov z uporabo U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (na voljo na <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDb>).

ELEMENTI PRESKUSA TA ER

Nujni elementi preskusa

11. Ta preskusna metoda se uporablja za preskuse, pri katerih se uporabi stabilno transfecirani ali endogeni receptor ER α in stabilno transfecirani konstrukt poročevalskega gena pod nadzorom enega ali več estrogenskih odzivnih elementov; prisotni pa so lahko tudi drugi receptorji, kot je ER β . To so nujni elementi preskusa.

Kontrole

12. Opisati je treba podlago za predlagane sočasne referenčne standarde za vsakega od preskusov z agonistom in antagonistom. Sočasne kontrole (negativna, s topilom in pozitivna) se, kakor je ustrezno, uporabljajo kot kazalnik, da preskus deluje v preskusnih pogojih, in zagotavljajo podlago za primerjave med poskusi; običajno spadajo med merila za sprejemljivost posameznega poskusa (1).

Standardni postopki kontrole kakovosti

13. Standardne postopke kontrole kakovosti je treba izvesti, kot je opisano za vsak preskus, za zagotovitev, da celična linija ostane stabilna skozi več pasaž, ne vsebuje mikoplazme (tj. brez bakterijske okužbe) in ohrani sposobnost za zagotovitev pričakovanih z ER povzročenih odzivov v daljšem časovnem obdobju. Poleg tega je treba preveriti pravilno identiteto celičnih linij in prisotnost drugih onesnaževal (npr. gliv, kvasovk in virusov).

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija

14. Pred preskušanjem neznanih kemikalij s katerim od preskusov v okviru te preskusne metode mora vsak laboratorij dokazati usposobljenost za uporabo preskusa. Za dokaz usposobljenosti mora preskusiti 14 snovi za preverjanje usposobljenosti, ki so v preglednici 3 navedene za preskus z agonistom, in 10 snovi za preverjanje usposobljenosti iz preglednice 4 za preskus z antagonistom. S tem preverjanjem usposobljenosti se potrdi tudi odzivnost preskusnega sistema. Seznam snovi za preverjanje usposobljenosti je podskupina referenčnih snovi, navedenih v standardih izvajanja za preskuse ER TA (6). Te snovi so na voljo na trgu, predstavljajo razrede kemikalij, ki se pogosto povezujejo z agonističnim ali antagonističnim delovanjem na ER, imajo primeren razpon jakosti, ki se pričakuje za agoniste/antagoniste ER (tj. močne do šibke), in vključujejo negativne snovi. Preskušanje snovi za preverjanje usposobljenosti je treba ponoviti vsaj dvakrat, in sicer na različna dneva. Usposobljenost se dokaže s pravilno razvrstitvijo (pozitivna/negativna) vsake snovi za preverjanje usposobljenosti. Preverjanje usposobljenosti mora ponoviti vsak tehnik, ko se uči preskusov. Odvisno od vrste celic se lahko nekatere od teh snovi za preverjanje usposobljenosti obnašajo kot SERM ter delujejo kot agonisti in antagonisti. Kljub temu so snovi za preverjanje usposobljenosti v preglednicah 3 in 4 razvrščene glede na poznano prevladujoče delovanje, ki ga je treba uporabiti pri ocenjevanju usposobljenosti.
15. Za dokaz učinkovitosti in za namene kontrole kakovosti mora vsak laboratorij vzpostaviti zbirko podatkov o agonistih in antagonistih iz preteklih preskusov s podatki za referenčni standard (npr. 17 β -estradiol in tamoksifen), pozitivne in negativne kontrolne kemikalije in kontrolo s topilom (npr. DMSO). Za začetek je treba zbirko podatkov ustvariti iz vsaj 10 neodvisnih ponovitev z agonisti (npr. 17 β -estradiolom) in 10 neodvisnih ponovitev z antagonistom (npr. tamoksifinom). Dodati je treba rezultate iz prihodnjih analiz teh referenčnih standardov in kontrol s topili, da se zbirka podatkov poveča, s čimer se zagotavljata doslednost in učinkovitost biološkega preskusa v laboratoriju v daljšem časovnem obdobju.

Preglednica 3
Seznam (14) snovi za preverjanje usposobljenosti za preskus z agonistom ⁽⁸⁾

Št. ⁽⁷⁾	Snov	Št. CAS	Pričakovani odziv ⁽¹⁾	Preskus STTA			Preskus VM7Luc ER TA		Kemijski razred po MeSH ⁽⁵⁾	Skupina proizvodov ⁽⁶⁾
				Vrednost PC ₁₀ (M) ⁽²⁾	Vrednost PC ₅₀ (M) ⁽²⁾	Preskusno območje koncentracije (M)	Vrednost VM7Luc EC ₅₀ (M) ⁽³⁾	Najvišja koncentracija za določanje območja (M) ⁽⁴⁾		
14	Dietilstilbestrol	56-53-1	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	od 10^{-14} do 10^{-8}	$3,34 \times 10^{-11}$	$3,73 \times 10^{-4}$	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
12	17 α -estradiol	57-91-0	POZ	$4,27 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	od 10^{-11} do 10^{-5}	$1,40 \times 10^{-9}$	$3,67 \times 10^{-3}$	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
15	Mezo-heksestrol	84-16-2	POZ	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	od 10^{-11} do 10^{-5}	$1,65 \times 10^{-11}$	$3,70 \times 10^{-3}$	ogljikovodik (ciklični), fenol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
11	4-terc-oktilfenol	140-66-9	POZ	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	od 10^{-11} do 10^{-5}	$3,19 \times 10^{-8}$	$4,85 \times 10^{-3}$	fenol	kemijski vmesni produkt
9	Genistein	446-72-0	POZ	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	od 10^{-11} do 10^{-5}	$2,71 \times 10^{-7}$	$3,70 \times 10^{-4}$	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt, vmesni farmacevtski produkt
6	Bisfenol A	80-05-7	POZ	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	od 10^{-11} do 10^{-5}	$5,33 \times 10^{-7}$	$4,38 \times 10^{-3}$	fenol	kemijski vmesni produkt

Št. (7)	Snov	Št. CAS	Pričakovani odziv (1)	Preskus STTA			Preskus VM7Luc ER TA		Kemijski razred po MeSH (5)	Skupina proizvodov (6)
				Vrednost PC ₁₀ (M) (2)	Vrednost PC ₅₀ (M) (2)	Preskusno območje koncentracije (M)	Vrednost VM7Luc EC ₅₀ (M) (3)	Najvišja koncentracija za določanje območja (M) (4)		
2	Kemferol	520-18-3	POZ	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	od 10^{-11} do 10^{-5}	$3,99 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-3}$	flavonoid, heterociklična spojina	naravni produkt
3	Butilbenzil fralat	85-68-7	POZ	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	od 10^{-11} do 10^{-5}	$1,98 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-4}$	karboksilna kislina, ester, ftalna kislina	mehčalo, industrijska kemikalija
4	P,p'-metoksiklor	72-43-5	POZ	$1,23 \times 10^{-6}$	—	od 10^{-11} do 10^{-5}	$1,92 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-3}$	ogljikovodik (halogenirani)	pesticid, veterinarsko sredstvo
1	Etil paraben	120-47-8	POZ	$5,00 \times 10^{-6}$	—	od 10^{-11} do 10^{-5}	$2,48 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-3}$	karboksilna kislina, fenol	farmacevtsko sredstvo, konzervans
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	—	od 10^{-10} do 10^{-4}	—	$4,64 \times 10^{-4}$	heterociklična spojina	herbicid
20	Spirolonolaktone	52-01-7	NEG	—	—	od 10^{-11} do 10^{-5}	—	$2,40 \times 10^{-3}$	laktone, steroid	farmacevtsko sredstvo

Št. (7)	Snov	Št. CAS	Pričakovani odziv (1)	Preskus STTA			Preskus VM7Luc ER TA		Kemijski razred po MeSH (5)	Skupina proizvodov (6)
				Vrednost PC ₁₀ (M) (2)	Vrednost PC ₅₀ (M) (2)	Preskusno območje koncentracije (M)	Vrednost VM7Luc EC ₅₀ (M) (3)	Najvišja koncentracija za določanje območja (M) (4)		
21	Ketokonazol	65277-42-1	NEG	—	—	od 10 ⁻¹¹ do 10 ⁻⁵	—	9,41 × 10 ⁻⁵	heterociklična spojina	farmacevtsko sredstvo
22	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	od 10 ⁻¹¹ do 10 ⁻⁵	—	1,64 × 10 ⁻³	heterociklična spojina, indol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); EC₅₀ = srednja efektivna koncentracija preskusne snovi; NEG = negativno; POZ = pozitivno; PC₁₀ (in PC₅₀) = koncentracija preskusne snovi, pri kateri odziv znaša 10 % (ali 50 % za PC₅₀) odziva, ki ga na posamezni plošči povzroči pozitivni kontrolni vzorec (E2, 1 nm).

(1) Razvrstitev med pozitivne ali negativne zaradi delovanja agonista ER je temeljila na dokumentu ICCVAM o pregledu ozadja preskusov vezave ER in TA (31) ter na empiričnih podatkih in drugih informacijah, pridobljenih iz referenčnih študij, ki so bile objavljene in pregledane po dokončanju dokumentov ICCVAM o pregledu ozadja (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

(2) Vrednosti iz osnutka poročila o predhodni validaciji in medlaboratorijski validaciji preskusa transkripcijske aktivacije (TA) s stabilno transfekcijo za zaznavo estrogenskega delovanja – preskus z reporterskim genom, povzročenim s človeškim estrogenskim receptorjem alfa, z uporabo celične linije hER-HeLa-9903 (30).

(3) Srednje vrednosti EC₅₀ so bile izračunane z vrednostmi, ki so jih sporočili laboratoriji iz validacijske študije VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM in Hiyoshi) (3).

(4) Sporočene koncentracije so bile najvišje preskušene koncentracije (določanje območja) med validacijo preskusa VM7Luc ER TA. Če so se koncentracije med laboratoriji razlikovale, je sporočena najvišja stičnega delovanja kemikalij na človeške estrogenske receptorje (3).

(5) Snovi so bile razvrščene v enega ali več kemijskih razredov z uporabo mednarodno priznanega standardiziranega sistema za razvrščanje, U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (na voljo na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

(6) Snovi so bile razvrščene v enega ali več razredov izdelkov z uporabo U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (na voljo na <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDb>).

(7) Iz preglednice 1 (seznam referenčnih kemikalij (22) za oceno točnosti agonista ER) standardov izvajanja (6).

(8) Če snov za preverjanje usposobljenosti ni več na voljo na trgu, se lahko uporabi snov z enako razvrstitvijo ter primerljivo jakostjo, načinom delovanja in kemijskim razredom.

Preglednica 4

Seznam (10) snovi za preverjanje usposobljenosti za preskus z antagonistom

	Snov ⁽¹⁾	Št. CAS	Preskus ER STTA ⁽²⁾			Preskus VM7Luc ER TA ⁽³⁾			Učinki kandidne snovi za ER STTA ⁽²⁾	Dogovorjena razvrstitev ⁽⁶⁾ ICCVAM	Kemijski razred MeSH ⁽⁷⁾	Skupina proizvodov ⁽⁸⁾
			Delovanje TA ER	IC ₅₀ (M)	Preskusno območje koncentracije (M)	Delovanje TA ER	IC ₅₀ ⁽⁴⁾ (M)	Najvišja koncentracija za določanje območja (M) ⁽⁵⁾				
1	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	POZ	$3,97 \times 10^{-9}$	od 10^{-12} do 10^{-7}	POZ	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	zmerno POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevsko sredstvo
2	Raloksifen HCl	82640-04-8	POZ	$7,86 \times 10^{-10}$	od 10^{-12} do 10^{-7}	POZ	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	zmerno POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevsko sredstvo
3	Tamoksifen	10540-29-1	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	od 10^{-10} do 10^{-5}	POZ	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	POZ	POZ	ogljikovodik (ciklični)	farmacevsko sredstvo
4	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	od 10^{-9} do 10^{-4}	NEG	—	$3,67 \times 10^{-3}$	Biti mora negativna ^(*)	DN	steroid	farmacevsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
5	Apigenin	520-36-5	NEG	—	od 10^{-9} do 10^{-4}	NEG	—	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	heterociklična spojina	Barvilo, naravni produkt, vmesni farmacevtski produkt
6	Di-n-butil ftalat	84-74-2	NEG	—	od 10^{-8} do 10^{-3}	NEG	—	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	ester, ftalna kislina	kozmetična sestavina, industrijska kemikalija, mehčalo

	Snov ⁽¹⁾	Št. CAS	Preskus ER STTA ⁽²⁾			Preskus VM7Luc ER TA ⁽³⁾			Učinki kandi- datne snovi za ER STTA ⁽²⁾	Dogovorjena razvrstitev ⁽⁶⁾ ICCVAM	Kemijski razred MeSH ⁽⁷⁾	Skupina proizvo- dov ⁽⁸⁾
			Delovanje TA ER	IC ₅₀ (M)	Preskusno območje koncentracije (M)	Delovanje TA ER	IC ₅₀ ⁽⁴⁾ (M)	Najvišja koncentracija za določanje območja (M) ⁽⁵⁾				
7	Flavon	525-82-6	NEG	—	od 10 ⁻⁸ do 10 ⁻³	NEG	—	4,50 × 10 ⁻⁴	Biti mora negativna (*)	DN	flavonoid, hete- rociklična spojina	naravni produkt, vmesni farma- cevtski produkt
8	Genistein	446-72-0	NEG	—	od 10 ⁻⁹ do 10 ⁻⁴	NEG	—	3,70 × 10 ⁻⁴	Biti mora negativna (*)	NEG	flavonoid, hete- rociklična spojina	naravni produkt, vmesni farma- cevtski produkt
9	P-n-nonilfe- nol	104-40-5	NEG	—	od 10 ⁻⁹ do 10 ⁻⁴	NEG	—	4,54 × 10 ⁻⁴	ni presku- šeno	NEG	fenol	kemijski vmesni produkt
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	od 10 ⁻⁸ do 10 ⁻³	NEG	—	4,38 × 10 ⁻⁴	Biti mora negativna (*)	NEG	ogljikovodik (ciklični)	naravni produkt

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); M = molar; IC₅₀ = srednja inhibicijska koncentracija preskusne snovi; NEG = negativno; DN = domnevno negativno; POZ = pozitivno.

(*) Razvrščena kot negativna glede na pregled virov (2).

(1) Običajne snovi, preskušene s preskusoma STTA in VM7Luc ER TA, ki so bile označene kot antagonist ER ali negativne in so bile uporabljene za oceno točnosti pri validacijski študiji VM7Luc ER TA (2) (3). Validacijsko poročilo o preskusu transkripcijske aktivacije s stabilno transfekcijo za zaznavo z ER povzročene delovanja, del B (2).

(2) Ocenjevalno poročilo ICCVAM o preskusni metodi LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA): metoda in vitro za opredelitev agonistov in antagonistov ER (3).

(3) Srednje vrednosti IC₅₀ so bile izračunane z vrednostmi, ki so jih sporočili laboratoriji iz validacijske študije VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM in Hiyoishi) (3).

(4) Sporočene koncentracije so bile najvišje preskušene koncentracije (določanje območja) med validacijo preskusa VM7Luc ER TA. Če so se koncentracije med laboratoriji razlikovale, je sporočena najvišja koncentracija. Glej preglednico 4-11 iz ocenjevalnega poročila ICCVAM o preskusni metodi; preskusna metoda LUMI-Cell@ER (VM7Luc ER TA): Preskus in vitro za opredelitev agonističnega in antagonističnega delovanja kemikalij na človeške estrogenske receptorje (3).

(5) Razvrstitev med antagonist ER ali negativne je temeljila na informacijah iz dokumenta ICCVAM o pregledu ozadja preskusnih metod vezave ER in TA (31) ter informacijah, pridobljenih iz objav, ki so bile objavljene in pregledane po dokončanju dokumentov ICCVAM o pregledu ozadja (2) (3) (18) (31).

(6) Snovi so bile razvrščene v enega ali več kemijskih razredov z uporabo mednarodno priznanega standardiziranega sistema za razvrščanje, U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (na voljo na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

(7) Snovi so bile razvrščene v enega ali več razredov izdelkov z uporabo U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (na voljo na <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

Merila za sprejemljivost ponovitve preskusa

16. Sprejetje ali zavrnitev ponovitve preskusa temelji na oceni rezultatov, dobljenih za referenčne standarde in kontrole, uporabljene za posamezni poskus. Vrednosti PC_{50} (EC_{50}) ali IC_{50} za referenčne standarde morajo izpolnjevati merila za sprejemljivost, kot so določena za izbrani preskus (za STTA glej Dodatek 2, za VM7Luc ER TA pa Dodatek 3), vse pozitivne/negativne kontrole pa je treba pravilno razvrstiti za vsak sprejeti poskus. Sposobnost dosledne izvedbe preskusa je treba dokazati z oblikovanjem in vzdrževanjem zbirke podatkov iz preteklih preskusov za referenčne standarde in kontrole (glej odstavek 15). Standardni odkloni ali koeficienti variacije (KV) za srednje vrednosti parametrov prileganja krivulj referenčnih standardov iz več poskusov se lahko uporabijo kot merilo za obnovljivost znotraj laboratorija. Poleg tega je treba upoštevati naslednja načela v zvezi z merili za sprejemljivost:

- podatki morajo zadostovati za kvantitativno oceno aktivacije ER (za preskus z agonistom) ali zaviranje ER (za preskus z antagonistom) (tj. učinkovitost in jakost);
- srednja vrednost dejavnosti reporterskega gena za referenčno koncentracijo referenčnega estrogena mora biti vsaj enaka najnižji vrednosti, določeni pri preskusih, glede na dejavnost kontrole z vehiklom (topilom), da se zagotovi ustrezna občutljivost. Za preskuse STTA in VM7Luc ER TA to pomeni štirikratnik srednje vrednosti kontrole z vehiklom na posamezni plošči;
- preskušene koncentracije morajo ostati znotraj območja topnosti preskusnih kemikalij in ne smejo biti citotoksične.

Analiza podatkov

17. Za razvrščanje pozitivnega in negativnega odziva je treba za vsak preskus uporabiti opredeljeni postopek za razlago podatkov.
18. Izpolnjevanje meril za sprejemljivost (odstavek 16) pokaže, da preskus deluje pravilno, vendar ne zagotavlja, da bodo pri vsaki posamezni ponovitvi preskusa dobljeni točni podatki. Najboljši znak, da so bili dobljeni točni podatki, je ponovitev rezultatov prve ponovitve. Če se z dvema ponovitvama dobijo ponovljivi rezultati (npr. rezultati obeh ponovitev preskusa kažejo, da je preskusna kemikalija pozitivna), tretje ponovitve ni treba izvesti.
19. Če se z dvema ponovitvama ne dobijo ponovljivi rezultati (npr. preskusna kemikalija je pri eni ponovitvi pozitivna, pri drugi pa negativna) ali če se zahteva višja stopnja gotovosti glede rezultata tega preskusa, je treba izvesti vsaj tri neodvisne ponovitve. V takem primeru razvrstitev temelji na dveh ujemajočih se rezultatih od treh.

Splošna merila za razlago rezultatov

20. Trenutno ni splošno sprejete metode za razlago podatkov ER TA. Kljub temu morata kvalitativna (npr. pozitivno/negativno) in/ali kvantitativna (npr. EC_{50} , PC_{50} , IC_{50}) ocena z ER povzročenega delovanja temeljiti na empiričnih podatkih in razumni znanstveni presoji. Če je mogoče, morata biti za pozitivne rezultate značilni tako velikost učinka v primerjavi s kontrolo z vehiklom (topilom) ali referenčnim estrogenom kot tudi koncentracija, pri kateri se učinek pojavi (npr. EC_{50} , PC_{50} , RPC_{Max} , IC_{50} itd.).

Poročilo o preskusu

21. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskus:

- uporabljeni preskus;
- kontrola/referenčni standard/preskusna kemikalija;
- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;

- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;
- meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

Snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Topilo/vehikel:

- opredelitev lastnosti (narava, dobavitelj in serija);
- utemeljitev izbire topila/vehikla;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu, če je znana.

Celice:

- vrsta in izvor celic:
 - Ali je ER endogeno izražen? Če ni, kateri receptorji so bili transfecirani?
 - Uporabljeni poročevalski konstrukti (vključno z izvornimi vrstami);
 - transfekcijska metoda;
 - izbirna metoda za vzdrževanje stabilne transfekcije (če je ustrezno);
 - Ali je transfekcijska metoda pomembna za stabilne linije?
- število pasaž celic (od odtajanja);
- številka pasaže celic ob odtajanju;
- metode vzdrževanja celičnih kultur.

Preskusni pogoji:

- omejitve topnosti;
- opis uporabljenih metod za ocenjevanje viabilnosti;
- sestava gojišč, koncentracija CO₂;
- koncentracije preskusne kemikalije;
- količina dodanega vehikla in preskusne kemikalije;
- inkubacijska temperatura in vlažnost;
- trajanje tretiranja;
- gostota celic ob začetku tretiranja in med njim;
- pozitivni in negativni referenčni standardi;
- poročevalski reagenti (ime izdelka, dobavitelj in serija);
- merila za obravnavanje preskusnih ponovitev kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih.

Preverjanje sprejemljivosti:

- razmerje indukcij za vsako preskusno ploščo in ali ustrezajo minimumu, zahtevanemu s preskusom, na podlagi kontrol iz preteklih preskusov;
- dejanske vrednosti za merila za sprejemljivost, npr. log₁₀EC₅₀, log₁₀PC₅₀, logIC₅₀ in vrednosti Hillovega naklona, za sočasne pozitivne kontrole/referenčne standarde.

Rezultati:

- neobdelani in normalizirani podatki;
- najvišja raven indukcije;
- podatki o citotoksičnosti;
- najnižja efektivna koncentracija, če obstaja;
- vrednosti RPC_{Max}, PC_{Max}, PC₅₀, IC₅₀ in/ali EC₅₀, kot je ustrezno;
- razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;

- statistične analize, če obstajajo, skupaj z meritvijo napake in zaupanja (npr. SEM, SD, CV ali 95 % CI) in opisom, kako so bile te vrednosti dobljene.

Razprava o rezultatih

Sklepna ugotovitev

VIRI

- (1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 225), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (4) Pujol, P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer. Res.*, 58(23): str. 5367–73.
- (5) Rogers, J. M., in Denison, M. S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research*, 13(1): str. 67–82.
- (6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 173), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 174), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (9) Cavailles, V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: str. 20–6.
- (10) Welboren, W. J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer*, 16(4): str. 1073–89.
- (11) Younes, M., in Honma, N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): str. 63–6.
- (12) Jefferson, W. N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, *Journal of Chromatography B*, 777(1-2): str. 179–189.

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

-
- (30) Jensen, E. V., *et al.* (1967). Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 56(3): str. 547–569.
- (31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (št. 03-4505.).
- (32) Kanno, J., *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, *Environ. Health Persp.*, 109:785-94.
- (33) Kanno, J., *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose-Response Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1530-1549.
- (34) Kanno, J., *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1550-1558.
- (35) Geisinger *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280–288.
- (36) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649–654.
- (37) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072–2081.
- (38) Rogers, J. M., in Denison, M. S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67–82.

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV IN OKRAJŠAVE

Merila za sprejemljivost: minimalni standardi za učinkovitost poskusnih kontrol in referenčnih standardov. Da se poskus šteje za veljaven, morajo biti izpolnjena vsa merila za sprejemljivost.

Točnost (skladnost): stopnja ujemanja rezultatov preskusa s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusa in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz 'skladnost' se pogosto izmenično uporabljata in pomenita delež ustreznih rezultatov preskusa (1).

Agonist: snov, ki ob vezavi na določen receptor povzroči odziv, npr. transkripcijo.

Antagonist: vrsta receptorskega liganda ali kemikalije, ki sama ob vezavi na receptor ne povzroči biološkega odziva, temveč blokira ali zmanjša z agonistom povzročene odzive.

Antiestrogensko delovanje: zmožnost kemikalije, da zavira z estrogenskimi receptorji povzročeno delovanje 17 β -estradiola.

Celična morfologija: oblika in videz celic, ki rastejo v monosloju v eni sami jamici plošče s tkivno kulturo. Celice, ki odmirajo, imajo pogosto nenormalno celično morfologijo.

TO: temeljni okvir OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev.

Tretiranje z ogljem/dekstranom: tretiranje seruma, uporabljenega v celični kulturi. Pri tretiranju z ogljem/dekstranom (ki se pogosto imenuje ločevanje) se odstranijo endogeni hormoni in proteini, ki se vežejo na hormone.

Kemikalija: snov ali zmes.

Citotoksičnost: škodljivi učinki na celično strukturo ali funkcijo, ki lahko nazadnje povzročijo celično smrt, pokažejo pa se lahko z zmanjšanjem števila celic v jamici ob koncu obdobja izpostavljenosti ali z zmanjšanjem sposobnosti za merjenje celične funkcije v primerjavi s sočasno kontrolo z vehiklom.

KV: koeficient variacije.

DCC-FBS: fetusni serum goveda, tretiran z ogljem, prevlečenim z dekstranom (Dextran-coated charcoal treated fetal bovine serum).

DMEM: Dulbeccovo modificirano Eagleovo gojišče.

DMSO: dimetil sulfoksid.

E2: 17 β -estradiol

EC50: srednja efektivna koncentracija preskusne kemikalije.

ED: endokrina motnja.

hER α : človeški estrogenski receptor alfa.

hER β : človeški estrogenski receptor beta.

EFM: gojišče, ki ne vsebuje estrogena. Dulbeccovo modificirano Eagleovo gojišče (DMEM), ki mu so mu dodani 4,5-odstotni FBS, tretiran z ogljem/dekstranom, 1,9-odstotni L-glutamin in 0,9-odstotna raztopina Pen-Strep.

ER: estrogenski receptor.

ERE: odzivni element za estrogen.

Estrogenska aktivnost: zmožnost kemikalije, da posnema 17 β -estradiol pri njegovi sposobnosti vezave na estrogenske receptorje in njihovo aktiviranje. S to preskusno metodo je mogoče zaznati s hER α povzročeno estrogensko aktivnost.

ERTA: transaktivacija estrogenskih receptorjev.

FBS: fetusni serum goveda.

HeLa: nesmrtna človeška celična linija materničnega vratu.

HeLa9903: subklon celice HeLa, v katerega sta bila stabilno transfecirana hER α in luciferazni poročevalski gen.

IC₅₀: srednja efektivna koncentracija inhibitorne preskusne snovi.

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod).

Obnovljivost med laboratoriji: merilo, v kakšnem obsegu lahko različni usposobljeni laboratoriji z uporabo istega protokola in preskušanjem istih snovi dobijo kvalitativno in kvantitativno podobne rezultate. Obnovljivost med laboratoriji se ugotovi med postopki pred validacijo in med njo ter kaže, v kakšnem obsegu se lahko preskus uspešno uporablja v več laboratorijih; imenuje se tudi obnovljivost v različnih laboratorijih (1).

Obnovljivost v laboratoriju: določitev, v kakšnem obsegu lahko usposobljene osebe v istem laboratoriju uspešno ponovijo rezultate z uporabo določenega protokola ob različnih časih. Imenuje se tudi obnovljivost znotraj laboratorija (1).

LEC: (Lowest Effective Concentration) je najnižja koncentracija preskusne kemikalije, ki povzroči odziv (tj. najnižja koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri se razmerje indukcije statistično razlikuje od sočasne kontrole z vehiklom).

Podoben preskus: pogovorni izraz za preskus, ki je strukturno in funkcionalno podoben validirani in sprejeti referenčni preskusni metodi. Uporablja se kot sopomenka za podobno preskusno metodo.

MT: metalotionein.

MMTV: virus tumorja mlečne žleze pri miših.

OHT: 4-hidroksitamoksifen.

PBTG: smernica za preskušanje na podlagi učinkovitosti.

PC (pozitivna kontrola): močno aktivna snov, po možnosti 17β -estradiol, ki je vključena v vse preskuse, da pomaga zagotoviti pravilno delovanje preskusa.

PC₁₀: koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je izmerjena aktivnost pri preskusu z agonistom enaka 10 % največje aktivnosti, povzročene s pozitivno kontrolo (E2 pri 1nM za preskus STTA) na posamezni plošči.

PC₅₀: koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je izmerjena aktivnost pri preskusu z agonistom enaka 50 % največje aktivnosti, povzročene s pozitivno kontrolo (E2 pri referenčni koncentraciji, določeni pri preskusni metodi) na posamezni plošči.

PC_{Max}: koncentracija preskusne kemikalije, ki povzroči RPCMax.

Standardi izvajanja: standardi, ki temeljijo na validiranem preskusu in so podlaga za oceno primerljivosti predlaganega preskusa, ki je funkcijsko in mehanistično podoben. Vključujejo: (1) nujne elemente preskusa; (2) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljivega izvajanja validirane preskusne metode, ter (3) primerljive stopnje točnosti in zanesljivosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, kar mora dokazati predlagani preskus pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (1).

Snovi za preverjanje usposobljenosti: podskupina referenčnih snovi, vključenih v standarde izvajanja, ki jih lahko laboratoriji uporabijo za dokazovanje tehnične usposobljenosti s standardizirano preskusno metodo. Običajno so med merili za izbor teh snovi: da predstavljajo celoten razpon odzivov, da so na voljo na trgu in da so zanje na voljo visokokakovostni referenčni podatki.

Usposobljenost: dokazana sposobnost za pravilno izvedbo preskusa pred preskušanjem neznanih snovi.

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

Referenčni standard: referenčna snov, s katero se dokaže ustreznost preskusa. Za preskuse STTA in VM7Luc ER TA je referenčni standard 17β -estradiol.

Referenčne preskusne metode: preskusi, na katerih temelji PBTG 455.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni, v kakšnem obsegu se s preskusom pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusa (1).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusa v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Ocení se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih.

RLU: relativne svetlobne enote.

RNK: ribonukleinska kislina.

RPC_{Max}: najvišja raven odziva, ki ga povzroči preskusna kemikalija, izražena kot delež odziva, ki ga povzroči 1 nM E2 na isti plošči.

RPMI: gojišče RPMI 1 640 z dodanima 0,9-odstotno raztopino Pen-Strep in 8,0-odstotnim fetusnim serumom goveda (FBS).

Ponovitev: posamezen poskus, s katerim se oceni kemijsko delovanje na biološki rezultat preskusa. Vsaka ponovitev je popoln poskus, opravljen na jamicah s ponovljenimi vzorci celic, hkrati nasajenih iz skupne zaloge celic.

Neodvisna ponovitev: ločen, neodvisen poskus, s katerim se oceni kemijsko delovanje na biološki rezultat preskusa, pri katerem se uporabijo celice iz druge zaloge in sveže razredčene kemikalije, ter ki je izveden na različne dneve ali pa ga na isti dan izvedejo različni člani osebja.

SO: standardni odklon.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih snovi, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (1).

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih snovi, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (1).

Stabilna transfekcija: ko se DNK transfecira v gojene celice tako, da se stabilno integrira v genom celic, kar povzroči stabilno izražanje transfeciranih genov. Kloni stabilno transfeciranih celic se izberejo s stabilnimi označevalci (npr. odpornost proti G418).

Preskus STTA: preskus transaktivacije s stabilno transfekcijo (Stably Transfected Transactivation Assay), preskus transkripcijske aktivacije ERα z uporabo celične linije HeLa 9 903.

Študija: vse vrste eksperimentalnega dela, namenjene oceni ene specifične snovi z uporabo specifičnega preskusa. Študija zajema vse korake, vključno s preskusi redčenja preskusne snovi v preskusnem mediju, predhodnimi ponovitvami za določanje območja, vsemi potrebnimi celovitimi ponovitvami, podatkovnimi analizami, zagotavljanjem kakovosti, ocenami citotoksičnosti itd. Dokončanje študije omogoča razvrstitev aktivnosti preskusne kemikalije na tarči toksičnosti (tj. aktivna, neaktivna ali neopredeljiva), ki se ocenjuje z uporabljenim preskusom, in oceno jakosti glede na pozitivno referenčno kemikalijo.

Snov: v skladu z uredbo REACH ⁽¹⁾ je snov opredeljena kot kemijski element in njegove spojine v naravnem stanju ali pridobljene s kakršnim koli proizvodnim procesom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev njene obstojnosti, in vsemi nečistotami, ki nastanejo pri uporabljenem procesu, ne vključuje pa topil, ki se lahko izločijo, ne da bi to vplivalo na obstojnost snovi ali spremenilo njeno sestavo. Zelo podobna opredelitev se uporablja v okviru GHS ZN (1).

TA (Transaktivacija): začetek sinteze mRNK v odziv na določen kemični signal, kot je vezava estrogena na estrogenski receptor.

Preskus: v okviru te preskusne metode je preskus ena od metodologij, ki so sprejete kot metodologije, ki veljavno izpolnjujejo načrtana merila za učinkovitost. Med elementi preskusa so na primer specifična celična linija s povezanimi rastnimi pogoji, specifični medij, v katerem poteka preskus, pogoji priprave plošče, razporeditev in razredčine preskusnih kemikalij skupaj z morebitnimi drugimi potrebnimi ukrepi za kontrolo kakovosti ter s tem povezanimi koraki za oceno podatkov.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Transkripcija: sinteza mRNK.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti in biološki materiali.

Validirana preskusna metoda: preskus, za katerega sta bili na podlagi končanih validacijskih študij določeni ustreznost (vključno s točnostjo) in zanesljivost za določen namen. Opozoriti je treba, da točnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bila sprejemljiva za predlagani namen (1).

Validacija: postopek, s katerim se določita zanesljivost in ustreznost posameznega pristopa, metode, preskusa, postopka ali ocene za opredeljen namen (1).

Kontrola z vehiklom: topilo, ki se uporabi za raztopitev preskusne in kontrolne kemikalije, se preskusi izključno kot vehikel brez raztopljene kemikalije.

VM7: nesmrtna celica adenokarcinoma, ki endogeno izraža estrogenski receptor.

VM7Luc4E2: celična linija VM7Luc4E2 je bila pridobljena iz nesmrtnih človeških celic adenokarcinoma VM7, ki endogeno izražajo obe obliki estrogenskih receptorjev (ER α in ER β) in so bile stabilno transfecirane s plazmidom pGud-Luc7.ERE. Ta plazmid vsebuje štiri kopije sintetičnega oligonukleotida, ki vsebuje odzivni element za estrogen nad promotorjem virusa tumorja mlečne žleze pri miši (MMTV) in kresničkin luciferazni gen.

Šibka pozitivna kontrola: šibko aktivna snov, izbrana s seznama referenčnih kemikalij, ki je vključena v vse preskuse, da pomaga zagotoviti pravilno delovanje preskusa.

⁽¹⁾ Uredba (ES) št. 1907/2006 Evropskega parlamenta in sveta z dne 18. decembra 2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH) ter o ustanovitvi Evropske agencije za kemikalije in o spremembi Direktive 1999/45/ES ter o razveljavitvi Uredbe Sveta (EGS) št. 793/93 in Uredbe Komisije (ES) št. 1488/94 ter Direktive Sveta 76/769/EGS in direktiv Komisije 91/155/EGS, 93/67/EGS, 93/105/ES in 2000/21/ES (UL L 304, 22.11.2007, str. 1).

Dodatek 2

PRESKUS TRANSAKTIVACIJE ČLOVEŠKEGA ESTROGENSKEGA RECEPTORJA-A S STABILNO TRANSFEKCIJO ZA ZAZNAVO ESTROGENSKEGA AGONISTIČNEGA IN ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA KEMIKALIJ Z UPORABO CELIČNE LINIJE HERA-HELA-9903

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

1. Pri tem preskusu transaktivacije (TA) se celična linija hER α -HeLa-9903 uporablja za zaznavo estrogenskega agonističnega delovanja, povzročenega s človeškim estrogenskim receptorjem alfa (hER α). Validacijska študija preskusa transaktivacije s stabilno transfekcijo (STTA), ki jo je japonski inštitut za ocenjevanje in raziskovanje kemikalij (CERI) izvedel z uporabo celične linije hER α -HeLa-9903 za zaznavo estrogenskega agonističnega in antagonističnega delovanja, povzročenega s človeškim estrogenskim receptorjem alfa (hER α), je pokazala ustreznost in zanesljivost preskusa za predvideni namen (1).
2. Ta preskus je izrecno namenjen zaznavi s hER α povzročene TA z merjenjem kemiluminiscence kot končne točke. Zaradi prevelike aktivacije luciferaznega poročevalskega gena se je o nereceptorsko povzročenih luminiscenčnih signalih sicer poročalo pri koncentracijah fitoestrogena, višjih od 1 μ M (2) (3). Čeprav krivulja odziva na odmerek kaže, da do dejanske aktivacije sistema ER pride pri nižjih koncentracijah, je treba izražanje luciferaze, dobljeno pri visokih koncentracijah fitoestrogenov ali podobnih spojin, ki domnevno povzročajo fitoestrogenu podobno preveliko aktivacijo luciferaznega poročevalskega gena, pazljivo preučiti v sistemih preskusa ER TA s stabilno transfekcijo (Dodatek 1).
3. Pred uporabo tega preskusa za regulativne namene je treba prebrati oddelka 'SPLOŠNI UVOD' in 'ELEMENTI PRESKUSA ER TA'. Opredelitve pojmov in kratice, uporabljene v tej smernici za preskušanje, so opisane v Dodatku 2.1.

NAČELO PRESKUSA (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

4. Preskus se uporablja za signaliziranje vezave estrogenskega receptorja z ligandom. Po vezavi liganda se kompleks receptor-ligand premesti na jedro, kjer se veže na specifične odzivne elemente DNK in transaktivira kresničkin luciferazni poročevalski gen, kar povzroči povečano celično izražanje luciferaznega encima. Luciferin je substrat, ki ga luciferazni encim pretvori v bioluminiscentni produkt, ki ga je mogoče kvantitativno izmeriti z luminometrom. Luciferazno aktivnost je mogoče hitro in poceni oceniti s številnimi preskusnimi kompleti, ki so na voljo na trgu.
5. Preskusni sistem uporablja celično linijo hER α -HeLa-9903, pridobljeno iz tumorja človeškega materničnega vratu, z dvema stabilno vstavljenima konstruktoma: (i) konstruktom za izražanje hER α (ki kodira celotno dolžino človeškega receptorja) in (ii) reporterskim konstruktom kresničkine luciferaze, ki nosi pet tandemskih ponovitev elementa, ki se odziva na estrogen (ERE), vitelogenina, ki ga sproži element TATA promotorja metalotioneina pri miših (MT). Genski konstrukt MT TATA pri miših se je izkazal kot najučinkovitejši in se pogosto uporablja. Posledično lahko ta celična linija hER α -HeLa-9903 meri sposobnost preskusne kemikalije, da sproži s hER α povzročeno transaktivacijo izražanja luciferaznega gena.
6. V primeru preskusa z agonistom ER je razlaga rezultatov odvisna od tega, ali je najvišja stopnja odziva, povzročenega s preskusno kemikalijo, večja ali enaka odzivu agonista, ki znaša 10 % odziva, povzročenega z najvišjo koncentracijo (1 nM) pozitivne kontrole (PC), tj. 17 β -estradiola (E2) (tj. PC10). V primeru preskusa z antagonistom ER je razlaga podatkov odvisna od tega, ali odziv pokaže vsaj 30-odstotno zmanjšanje aktivnosti v primerjavi z odzivom, ki ga sproži eksogena sintetična kontrola (*spike in*) (25 pM E2) brez citotoksičnosti. Analiza in razlaga podatkov sta podrobno obravnavani v odstavkih 34–48.

POSTOPEK**Celične linije**

7. Za preskus je treba uporabiti stabilno transfecirano celično linijo hERα-HeLa-9903. Celično linijo je mogoče po podpisu sporazuma o prenosu materiala dobiti od celične banke Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) ⁽¹⁾.
8. Pri preskušanju se lahko uporabijo samo celice, za katere velja, da so brez mikoplazme. Priporočena metoda za občutljivo zaznavo okužbe z mikoplazmo je RT-PCR (verižna reakcija s polimerazo v realnem času) (4) (5) (6).

Stabilnost celične linije

9. Za spremljanje stabilnosti celične linije je treba uporabiti E2, 17α-estradiol, 17α-metiltestosteron in kortikosteron kot referenčne standarde za preskus z agonistom, celotno krivuljo odziva na odmerek v območju preskusne koncentracije, navedenem v preglednici 1, pa je treba izmeriti vsaj enkrat ob vsaki izvedbi preskusa, pri čemer se morajo rezultati ujemati z rezultati, navedenimi v preglednici 1.
10. V primeru preskusa z antagonistom je treba sočasno z vsako ponovitvijo izmeriti celotni krivulji koncentracije za dva referenčna standarda, in sicer tamoksifen in flutamid. Spremljati je treba pravilno kvalitativno razvrstitev obeh kemikalij med pozitivne ali negativne.

Pogoji gojenja celičnih kultur in nasaditve na ploščo

11. Celice je treba vzdrževati v Eagleovem minimalnem osnovnem gojišču (EMEM) brez fenol rdečega, dopolnjenem s 60 mg/l antibiotika kanamicina in 10-odstotnim fetusnim serumom goveda, tretiranim z ogljem, prevlečenim z dekstranom (DCC-FBS), v inkubatorju s CO₂ (5 % CO₂) pri 37 ± 1 °C. Ko je dosežena 75–90-odstotna konfluentnost, se lahko celice kultivirajo na novem gojišču v 10 ml 0,4 x 10⁵ – 1 x 10⁵ celic/ml za 100-milimetrsko posodico za gojenje celičnih kultur. Celice je treba suspendirati z 10-odstotnim FBS-EMEM (kar je enako kot EMEM z DCC-FBS) in jih nato nasaditi v jamice mikrotitrne plošče z gostoto 1 x 10⁴ celic/(100 µl x jamica). Nato je treba celice predinkubirati v inkubatorju s 5 % CO₂ pri 37 ± 1 °C tri ure pred izpostavitvijo kemikaliji. V plastičnih posodah ne sme biti estrogenskega delovanja.
12. Da se ohrani celovitost odziva, je treba celice iz zamrznjene zaloge več kot eno pasažo gojiti v kondicioniranem gojišču, ne smejo pa biti gojene več kot 40 pasaž. Za celično linijo hERα-HeLa-9903 to pomeni manj kot tri mesece. Vendar se lahko učinkovitost celic zmanjša, če rastejo v neprimernih pogojih za gojenje.
13. DCC-FBS se lahko pripravi, kot je opisano v Dodatku 2.2, ali pridobi iz komercialnih virov.

Merila za sprejemljivost

Pozitivni in negativni referenčni standardi za preskus z agonistom ER

14. Pred študijo in med njo je treba odzivnost preskusnega sistema preveriti z uporabo ustreznih koncentracij močnega estrogena: E2, šibkega estrogena (17α-estradiol), zelo šibkega agonista (17α-metiltestosteron) in negativne snovi (kortikosteron). Vrednosti sprejemljivega razpona, izpeljane iz validacijske študije (1), so navedene v preglednici 1. Te štiri sočasne referenčne standarde je treba vključiti v vsak poskus, rezultati pa morajo biti znotraj navedenih sprejemljivih mejnih vrednosti. V nasprotnem primeru je treba ugotoviti vzrok za neizpolnjevanje meril za sprejemljivost (npr. ravnanje s celicami ter serum in antibiotiki za kakovost in koncentracijo) in preskus ponoviti. Ko so

⁽¹⁾ Celična banka JCRB: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japonska; telefaks: +81 726419812.

dosežena merila za sprejemljivost, je za zagotovitev minimalne variabilnosti vrednosti EC_{50} , PC_{50} in PC_{10} bistvena dosledna uporaba materialov za gojenje celic. Vsi štirje sočasni referenčni standardi, ki jih je treba vključiti v vsak poskus (izveden pod enakimi pogoji, vključno z materiali, ravno pasaže celic in tehniki), lahko zagotovijo občutljivost preskusa, ker morajo biti vrednosti PC_{10} treh pozitivnih referenčnih standardov znotraj sprejemljivega razpona, tako kot tudi vrednosti PC_{50} in EC_{50} , kadar jih je mogoče izračunati (glej preglednico 1).

Preglednica 1

Vrednosti sprejemljivega razpona štirih referenčnih standardov za preskus z agonistom ER

Ime	$\log PC_{50}$	$\log PC_{10}$	$\log EC_{50}$	Hillov naklon	Razpon preskusa
17 β -estradiol (E2) št. CAS: 50-28-2	od -11,4 do ~ -10,1	< -11	od -11,3 do ~ -10,1	od 0,7 do ~ 1,5	od 10^{-14} do ~ 10^{-8} M
17 α -estradiol št. CAS: 57-91-0	od -9,6 do ~ -8,1	od -10,7 do ~ -9,3	od -9,6 do ~ -8,4	od 0,9 do ~ 2,0	od 10^{-12} do ~ 10^{-6} M
Kortikosteron št. CAS: 50-22-6	—	—	—	—	od 10^{-10} do ~ 10^{-4} M
17 α -metiltestosteron št. CAS: 58-18-4	od -6,0 do ~ -5,1	od -8,0 do ~ -6,2	—	—	od 10^{-11} do ~ 10^{-5} M

Pozitivni in negativni referenčni standardi pri preskusu z antagonistom ER

15. Pred študijo in med njo je treba odzivnost preskusnega sistema preveriti z uporabo ustreznih koncentracij pozitivne snovi (tamoksifena) in negativne snovi (flutamida). Vrednosti sprejemljivega razpona, izpeljane iz validacijske študije (1), so navedene v preglednici 2. Ta dva sočasna referenčna standarda je treba vključiti v vsak poskus, rezultate pa je treba šteti za pravilne, kot je prikazano v merilih. V nasprotnem primeru je treba ugotoviti vzrok za neizpolnjevanje meril (npr. ravnanje s celicami ter serum in antibiotiki za kakovost in koncentracijo) in preskus ponoviti. Poleg tega je treba izračunati vrednosti IC_{50} za pozitivno snov (tamoksifen), rezultati pa morajo biti znotraj navedenih sprejemljivih mejnih vrednosti. Ko so dosežena merila za sprejemljivost, je za zagotovitev minimalne variabilnosti vrednosti IC_{50} bistvena dosledna uporaba materialov za gojenje celic. Občutljivost preskusa lahko zagotovita oba sočasna referenčna standarda, ki ju je treba vključiti v vsak poskus (izveden pod enakimi pogoji, vključno z materiali, ravno pasaže celic in tehniki) (glej preglednico 2).

Preglednica 2

Merila in vrednosti sprejemljivega razpona obeh referenčnih standardov za preskus z antagonistom ER

Ime	Merila	$\log IC_{50}$	Razpon preskusa
Tamoksifen št. CAS: 10540-29-1	Pozitivno: izračunati je treba IC_{50}	od -5,942 do ~ -7,596	od 10^{-10} do ~ 10^{-5} M
Flutamid št. CAS: 13311-84-7	Negativno: izračunati je treba IC_{30}	—	od 10^{-10} do ~ 10^{-5} M

Pozitivna kontrola in kontrola z vehiklom

16. Pozitivno kontrolo (PC) za preskus z agonistom ER (1 nM E2) in preskus z antagonistom ER (10 μ M TAM) je treba preskusiti v vsaj treh ponovitvah na vsaki plošči. Vehikel, v katerem se raztopi preskusna kemikalija, je treba preskusiti kot kontrolo z vehiklom (VC) v vsaj treh ponovitvah na vsaki plošči. Če se pri pozitivni kontroli uporabi drug vehikel kot za preskusno kemikalijo, je treba poleg te kontrole z vehiklom v vsaj treh ponovitvah na isti plošči s pozitivno kontrolo preskusiti še drugo kontrolo z vehiklom.

Merila kakovosti za preskus z agonistom ER

17. Srednja vrednost luciferazne aktivnosti pozitivne kontrole (1 nM E2) mora biti vsaj 4-kratnik srednje vrednosti kontrole z vehiklom na vsaki plošči. To merilo je določeno na podlagi zanesljivosti vrednosti končnih točk iz validacijske študije (pri preteklih preskusih med 4- in 30-kratnikom).
18. Kar zadeva kontrolo kakovosti preskusa, mora biti razmerje indukcije, ki ustreza vrednosti PC10 sočasne pozitivne kontrole (1 nM E2), večje od 1 + 2 standardnega odklona (SD) vrednosti razmerja indukcije (= 1) sočasne kontrole z vehiklom. Za namene prednostnega razvrščanja je lahko vrednost PC10 koristna za poenostavitev potrebne podatkovne analize v primerjavi s statistično analizo. Čeprav statistična analiza zagotovi podatke o statistični značilnosti, taka analiza ni kvantitativni parameter v zvezi s potencialom na podlagi koncentracije, zato je manj koristna za namene prednostnega razvrščanja.

Merila kakovosti za preskus z antagonistom ER

19. Srednja vrednost luciferazne aktivnosti eksogene sintetične kontrole (*spike-in*) (25 nM E2) mora biti vsaj 4-kratnik srednje vrednosti kontrole z vehiklom na vsaki plošči. To merilo je določeno na podlagi zanesljivosti vrednosti končnih točk iz validacijske študije.
20. Kar zadeva kontrolo kakovosti preskusa, mora biti relativna transkripcijska aktivacija (RTA) 1 nM E2 večja od 100 %, RTA 1 μ M 4-hidroksitamoksifena (OHT) mora znašati manj kot 40,6 %, RTA 100 μ M digitonina (Dig) pa mora znašati manj kot 0 %.

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija (glej odstavek 14 ter preglednici 3 in 4 v oddelku „ELEMENTI PRESKUSA ER TA“ te preskusne metode)

Vehikel

21. Kot sočasno kontrolo z vehiklom je treba uporabiti dimetil sulfoksid (DMSO) ali ustrezno topilo pri enaki koncentraciji, kot se uporablja za različne pozitivne in negativne kontrole ter preskusne kemikalije. Preskusne kemikalije je treba raztopiti v topilu, v katerem je topna zadevna preskusna kemikalija in ki se meša s celičnim gojiščem. Primerni vehikli so voda, etanol (od 95- do 100-odstotna čistost) in DMSO. Če se uporabi DMSO, raven ne sme preseči 0,1 vol. %. Za vsak vehikel je treba dokazati, da največja uporabljena količina ni citotoksična in ne moti učinkovitosti preskusa.

Priprava preskusnih kemikalij

22. Na splošno je treba preskusne kemikalije raztopiti v DMSO ali drugem primernem topilu in jih zaporedoma razredčiti z istim topilom v običajnem razmerju 1: 10, da se pripravijo raztopine za redčenje z medijem.

Topnost in citotoksičnost: preudarki glede določanja območja

23. Izvesti je treba predhodni preskus, da se ugotovi ustrezno območje koncentracije kemikalije, ki se preskuša, in preveri, ali bi se lahko za preskusno kemikalijo pojavile težave s topnostjo in citotoksičnostjo. Kemikalije se najprej preskusijo do največje koncentracije 1 μ l/ml, 1 mg/ml ali 1 mM, pri čemer se upošteva najnižja od teh koncentracij. Glede na stopnjo citotoksičnosti ali pomanjkanje topnosti, opaženo v predhodnem preskusu, je treba pri prvi dokončni ponovitvi kemikalijo preskusiti z logaritmskimi zaporednimi razredčinami, ki se začnejo pri najvišji dopustni koncentraciji (npr. 1 mM, 100 μ M, 10 μ M itd.), in zapisati morebitno motnost, oborino ali citotoksičnost. Koncentracije pri drugi, in če je potrebno, tretji ponovitvi je treba ustrezno prilagoditi, da se bolje opredeli krivulja odziva na koncentracijo in preprečijo koncentracije, za katere se ugotovi, da niso topne ali da povzročajo preveliko citotoksičnost.

24. Pri agonistih in antagonistih ER se lahko zaradi naraščajočih ravni citotoksičnosti bistveno spremeni ali odpravi značilni sigmoidni odziv, kar je treba upoštevati pri razlagi podatkov. Uporabiti je treba metode preskušanja citotoksičnosti, ki lahko zagotovijo informacije v zvezi z 80-odstotno viabilnostjo celic, pri čemer se na podlagi izkušenj laboratorija uporabi ustrezen preskus.
25. Če rezultati preskusa citotoksičnosti pokažejo, da se je zaradi koncentracije preskusne kemikalije število celic zmanjšalo za 20 % ali več, je treba to koncentracijo šteti za citotoksično, koncentracije, ki so enake citotoksični koncentraciji ali višje od nje, pa je treba izključiti iz ocene.

Izpostavitve kemikalij in razporeditev na preskusni plošči

26. Postopek redčenja kemikalije (1. in 2. korak) in izpostavitve celicam (3. korak) se lahko izvede, kot je opisano v nadaljevanju.

1. korak Vsako preskusno kemikalijo je treba zaporedno razredčiti v DMSO ali ustreznem topilu in dodati v jamice na mikrotitrski plošči, da se dosežejo končne zaporedne koncentracije, kot so določene s predhodnim preskusom za določanje območja (običajno v nizu 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM in 10 pM (od 10^{-3} do 10^{-11} M)), za preskušanje v treh ponovitvah.

2. korak Redčenje kemikalije: najprej razredčite 1,5 µl preskusne kemikalije v topilu do količine 500 µl medija.

3. korak Izpostavitve celic kemikaliji: dodajte 50 µl razredčine z medijem (pripravljene v 2. koraku) v preskusno jamico, ki vsebuje 10^4 celic/100 µl/jamico.

Priporočena končna količina medija, potrebna za vsako jamico, je 150 µl. Preskusni vzorci in referenčni standardi se lahko razvrstijo, kot je prikazano v preglednicah 3 in 4.

Preglednica 3

Primer razvrstitve referenčnih standardov glede na koncentracije na preskusni plošči pri preskusu z agonistom ER

Vrstica	17α-metiltestosteron			Kortikosteron			17α-estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola z vehiklom (0,1 % DMSO); PC: pozitivna kontrola (1 nM E2)

= z dodatkom 25 pM E2.

28. Za oceno antagonističnega delovanja kemikalij je treba preskusnim jamicam v vrsticah od A do G dodati 25 pM E2. Referenčna standarda (tamoksifen in flutamid) je treba preskusiti pri vsaki ponovitvi. Na vsako preskusno ploščo je treba vključiti jamice s pozitivno kontrolo, tretirane z 1 nM E2, ki se lahko uporabijo za kontrolo kakovosti celične linije hERα-HeLa-9903, jamice s kontrolo z vehiklom, tretirane z DMSO (ali ustreznim topilom), jamice z 0,1 % DMSO, tretirane z dodanim DMSO v dodatku E2, ki ustreza eksogeni sintetični kontroli (Spike-in-control), jamice, tretirane s končno koncentracijo 1 μM OHT, in jamice, tretirane s 100 μM Dig (preglednica 5). Naslednja preskusna plošča mora imeti enako razporeditev, a brez jamic z referenčnimi standardi (preglednica 6). Če se pri istem poskusu uporabijo celice iz različnih virov (npr. različna številka pasaže, različna serija itd.), je treba referenčne standarde preskusiti za vsak vir celic.

Preglednica 6

Primer razvrstitve preskusnih kemikalij in kemikalij za kontrolo plošč glede na koncentracije na preskusni plošči pri preskusu z antagonistom ER

Vrstica	Tamoksifen			Flutamid			Preskusna kemikalija 1			Preskusna kemikalija 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: kontrola z vehiklom (0,1 % DMSO), PC: pozitivna kontrola (1 nM E2), OHT: 4-hidroksitamoksifen, dig: digitonin.

 = z dodatkom 25 pM E2.

29. Potrditi je treba neobstoj učinkov robov, če je ustrezno, če pa se sumi, da ti obstajajo, je treba spremeniti razporeditev plošče, da se taki učinki preprečijo. Uporabi se lahko na primer razporeditev na plošči, pri kateri ni robnih jamic.
30. Po dodajanju kemikalij je treba preskusne plošče od 20 do 24 ur inkubirati v inkubatorju s 5 % CO₂ pri 37 ± 1 °C, da se povzroči nastanek produktov poročevalskega gena.
31. Posebni preudarki so potrebni pri spojinah, ki so zelo hlapne. V takih primerih lahko kontrolne jamice v bližini dajo lažno pozitivne rezultate, kar je treba upoštevati glede na pričakovane vrednosti in vrednosti kontrol pri preteklih preskusih. V redkih primerih, ko je hlapnost lahko problematična, je mogoče z uporabo 'tesnil' za plošče med preskušanjem učinkovito izolirati posamezne jamice, zato je v takih primerih njihova uporaba priporočljiva.
32. Ponovitve dokončnih preskusov za isto kemikalijo je treba izvesti na različne dneve, da se zagotovi neodvisnost.

Preskus z luciferazo

33. Za preskus se lahko uporabi na trgu dostopen luciferazni reagent (npr. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 ali enakovreden)) ali standardni sistem preskusa z luciferazo (npr. Promega, E1500 ali enakovreden), če so izpolnjena merila za sprejemljivost. Preskusne reagentne je treba izbrati na podlagi občutljivosti luminometra, ki bo uporabljen. Kadar se uporabi standardni sistem preskusa z luciferazo, je treba pred dodajanjem substrata uporabiti lizni reagent za celično kulturo (npr. Promega, E1531 ali enakovreden). Luciferazni reagent je treba nanesti po navodilih proizvajalca.

ANALIZA PODATKOV

Preskus z agonistom ER

34. V primeru preskusa z agonistom ER, katerega cilj je dobiti relativno transkripcijsko aktivnost za pozitivno kontrolo (1 nM E2), se lahko luminiscenčni signali z iste plošče analizirajo v korakih, opisanih v nadaljevanju (sprejemljivi so tudi drugi enakovredni matematični postopki).

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom.

2. korak Od vrednosti za posamezno jamico odštejte srednjo vrednost kontrole z vehiklom, da normalizirate podatke.

3. korak Izračunajte srednjo vrednost za normalizirano pozitivno kontrolo.

4. korak Normalizirano vrednost vsake jamice na plošči delite s srednjo vrednostjo normalizirane pozitivne kontrole (pozitivna kontrola = 100 %).

Končna vrednost vsake jamice je relativna transkripcijska aktivnost za zadevno jamico v primerjavi z odzivom pozitivne kontrole.

5. korak Izračunajte srednjo vrednost relativne transkripcijske aktivnosti za vsako skupino koncentracije preskusne kemikalije. Dimenziji odziva sta dve: izračunana povprečna transkripcijsko aktivnost (odziv) in koncentracija, pri kateri pride do odziva (glej naslednji oddelek).

Preudarki v zvezi z indukcijo EC₅₀, PC₅₀ in PC₁₀

35. Za izračun EC₅₀ je potrebna celotna krivulja odziva na koncentracijo, vendar to morda ni vedno dosegljivo ali praktično zaradi omejitev razpona preskusnih koncentracij (na primer zaradi težav s toksičnostjo ali topnostjo). Ker pa sta EC₅₀ in najvišja raven indukcije (ki ustreza zgornji vrednosti Hillove enačbe) informativna parametra, ju je treba po možnosti navesti. Za izračun EC₅₀ in najvišje ravni indukcije je treba uporabiti ustrezno statistično programsko opremo (npr. Graphpad Prism). Če se lahko Hillova logistična enačba uporabi za podatke o odzivu na koncentracijo, je treba EC₅₀ izračunati z naslednjo enačbo (7):

$$Y = \text{dno} + (\text{vrh} - \text{dno}) / (1 + 10^{\text{eksp}((\log \text{EC}_{50} - X) \times \text{Hillov naklon}))}$$
, kjer je:

X logaritem koncentracije in

Y odziv, pri čemer se Y začne na dnu in gre do vrha na sigmoidni krivulji. Dno je v Hillovi logistični enačbi določeno pri nič.

36. Za vsako preskusno kemikalijo je treba zagotoviti naslednje:

RPCMax, ki je najvišja stopnja odziva, povzročenega s preskusno kemikalijo, izražena kot delež odziva, povzročenega z 1 nM E2 na isti plošči, in PC_{Max} (koncentracija, povezana z RPCMax); in

za pozitivne kemikalije koncentracije, ki povzročijo PC10, in če je ustrezno, PC50.

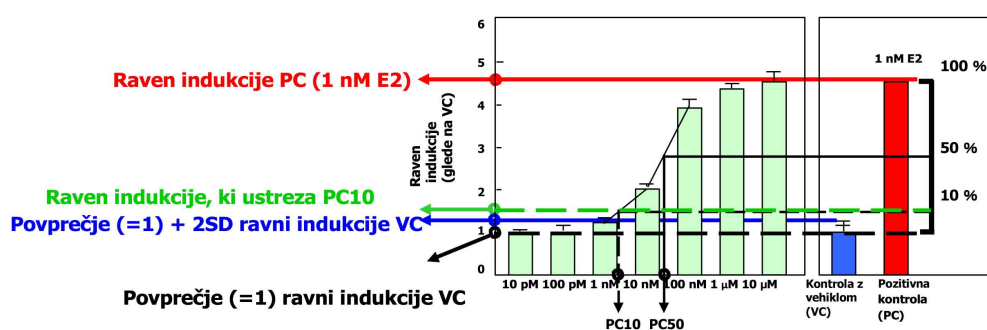
37. Vrednost PCx se lahko izračuna z interpolacijo med dvema točkama na koordinati X-Y, pri čemer je ena tik nad vrednostjo PCx in ena tik pod njo. Kadar imata podatkovni točki, ki ležita tik nad vrednostjo PCx in pod njo, koordinate (a, b) oziroma (c, d), se lahko vrednost PCx izračuna z uporabo naslednje enačbe:

$$\log[PCx] = \log[c] + (x - d)/(d - b)$$

38. Opisi vrednosti PC so navedeni na sliki 1 v nadaljevanju.

Slika 1

Primer izpeljave vrednosti PC. PC (1 nM E2) je vključena na vsako preskusno ploščo.



Preskus z antagonistom ER

39. V primeru preskusa z antagonistom ER, katerega cilj je dobiti relativno transkripcijsko aktivnost (RTA) za eksogeno sintetično kontrolo (*spike in*) (25 pM E2), se lahko luminiscenčni signali z iste plošče analizirajo v korakih, opisanih v nadaljevanju (sprejemljivi so tudi drugi enakovredni matematični postopki).

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom.
 2. korak Od vrednosti za posamezno jamico odštejte srednjo vrednost kontrole z vehiklom, da normalizirate podatke.
 3. korak Izračunajte srednjo vrednost za normalizirano eksogeno sintetično kontrolo (*spike in*).
 4. korak Normalizirano vrednost vsake jamice na plošči delite s srednjo vrednostjo normalizirane eksogene sintetične kontrole (*spike in*) (eksogena sintetična kontrola = 100 %).
- Končna vrednost vsake jamice je relativna transkripcijska aktivnost za zadevno jamico glede na odziv eksogene sintetične kontrole (*spike in*).
5. korak Za vsako tretiranje izračunajte srednjo vrednost relativne transkripcijske aktivnosti.

Preudarki v zvezi z indukcijo IC₃₀ in IC₅₀

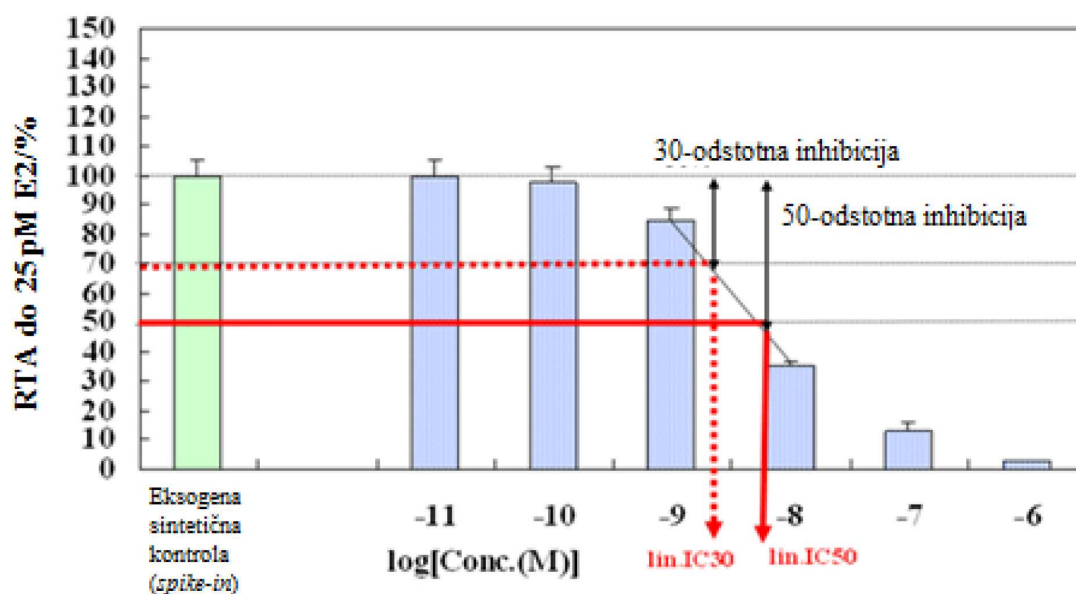
40. Za pozitivne kemikalije je treba zagotoviti koncentracije, ki povzročijo IC30, in če je ustrezno, IC50.

41. Vrednost IC_x se lahko izračuna z interpolacijo med dvema točkama na koordinati X-Y, pri čemer je ena tik nad vrednostjo IC_x in ena tik pod njo. Kadar imata podatkovni točki, ki ležita tik nad vrednostjo IC_x in pod njo, koordinate (c, d) oziroma (a, b), se lahko vrednost IC_x izračuna z uporabo naslednje enačbe:

$$\text{lin IC}_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

Slika 2

Primer izpeljave vrednosti IC. Eksogena sintetična kontrola (*spike in*) (25 pM E2) je vključena na vsako preskusno ploščo.



RTA: relativna transkripcijska aktivnost.

42. Rezultati morajo temeljiti na dveh (ali treh) neodvisnih ponovitvah. Če se z dvema ponovitvama dobijo primerljivi in torej obnovljivi rezultati, tretje ponovitve ni treba izvesti. Rezultati so sprejemljivi, če:

- izpolnjujejo merila za sprejemljivost (glej merila za sprejemljivost v odstavkih 14–20),
- so obnovljivi.

Merila za razlago rezultatov

Preglednica 7

Merila za odločitev, ali je pri preskusu z agonistom ER snov pozitivna ali negativna

Pozitivna	Če je dobljena vrednost RPC_{Max} najmanj enaka 10 % odziva pozitivne kontrole pri vsaj dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev.
Negativna	Če vrednost RPC_{Max} ne doseže vsaj 10 % odziva pozitivne kontrole pri dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev.

Preglednica 8

Merila za negativno in pozitivno odločitev pri preskusu z antagonistom ER

Pozitivna	Če je vrednost IC30 izračunana pri vsaj dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev.
Negativna	Če vrednost IC30 ni izračunana pri dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev.

43. Merila za razlago podatkov so prikazana v preglednicah 7 in 8. Za pozitivne rezultate sta značilni velikost učinka in koncentracija, pri kateri se pojavi učinek. Oba ta cilja sta dosežena, če so rezultati izraženi kot koncentracija, pri kateri sta vrednosti PC 50 % (PC50) ali 10 % (PC10) doseženi pri preskusu z agonistom, vrednost 50 % (IC50) ali 30 % (IC30) eksogene sintetične kontrole (*spike-in*) pa je pri preskusu z antagonistom zavrta. Preskusna kemikalija je sicer določena kot pozitivna, če je največji odziv, ki ga sproži preskusna kemikalija (RPCMax), najmanj enak 10 % odziva PC pri vsaj dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev, medtem ko se preskusna kemikalija šteje za negativno, če RPCMax ne doseže vsaj 10 % odziva pozitivne kontrole pri dveh od dveh ali dveh od treh ponovitev.
44. Za izračune PC10, PC50 in PCMax pri preskusu z agonistom ER ter IC30 in IC50 pri preskusu z antagonistom ER se lahko uporabi preglednica, ki je skupaj s smernico za preskušanje na voljo na javnem spletnem mestu OECD ⁽²⁾.
45. Zadostovati bi moralo, da se vrednosti PC10 ali PC50 in IC30 ali IC50 dobijo vsaj dvakrat. Če pa tako dobljena referenčna vrednost za podatke v istem območju koncentracije kaže variabilnost z nedopustno visokim koeficientom variacije (KV; %), podatkov ni mogoče šteti za zanesljive in je treba opredeliti izvor tako visoke variabilnosti. KV neobdelanih podatkov treh ponovitev (tj. podatkov o intenzivnosti luminescence) za podatkovne točke, ki se uporabijo za izračun PC10, mora biti manjši od 20 %.
46. Izpolnjevanje meril za sprejemljivost kaže, da preskusni sistem deluje pravilno, vendar ne zagotavlja, da bodo pri vsaki posamezni ponovitvi preskusa dobljeni točni podatki. Najboljše zagotovilo, da so bili dobljeni točni podatki, je podvojitev rezultatov prve ponovitve.
47. V primeru preskusa z agonistom ER, če je poleg te smernice za preskušanje za namene presejanja in prednostnega razvrščanja za pozitivne preskusne kemikalije potrebnih še več informacij, zlasti za kemikalije PC10-PC49 in kemikalije, za katere se sumi, da pretirano spodbujajo luciferazo, se lahko z uporabo antagonistu ERa potrdi, da gre pri opaženi luciferazni aktivnosti izključno za odziv, povezan z ERa (glej Dodatek 2.1).

POROČILO O PRESKUSU

48. Glej odstavek 20 'ELEMENTI PRESKUSA TA ER'.

VIRI

- (1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 225), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (2) Escande, A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459–1469.
- (3) Kuiper, G. G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.*, 139, 4252–4263.

⁽²⁾ <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

-
- (4) Spaepen, M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, 78(1), 89–94.
- (5) Kobayashi, H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769–71.
- (6) Dussurget, O., in Roulland-Dussoix, D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 953–9.
- (7) De Lean, A., Munson, P. J., in Rodbard, D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, *Am. J. Physiol.*, 235, E97-E102.

Dodatek 2.1

LAŽNO POZITIVNI REZULTATI: OCENA NERECEPTORSKO POVZROČENIH LUMINISCENČNIH SIGNALOV

1. Lažno pozitivne rezultate pri preskusu z agonistom ER lahko povzroči aktivacija luciferaznega gena, ki ni povzročena z ER, ali neposredna aktivacija genskega produkta ali nepovezane fluorescence. Na take učinke kaže nepopolna ali neobičajna krivulja odziva na odmere. Če se sumi o obstoju takih učinkov, je treba preučiti učinek antagonist ER (npr. 4-hidroksitamoksifena (OHT) pri netoksični koncentraciji) na odziv. Čisti antagonist ICI 1827 80 morda ni primeren za ta namen, saj se lahko zaradi zadostne koncentracije ICI 1827 80 zniža vrednost kontrole z vehiklom, kar vpliva na podatkovno analizo.
2. Za zagotovitev veljavnosti tega pristopa je treba na isti plošči preskusiti naslednje:
 - agonistično delovanje neznane kemikalije z/brez 10 μ M OHT,
 - kontrolo z vehiklom (v treh ponovitvah),
 - OHT (v treh ponovitvah),
 - 1 nM E2 (v treh ponovitvah) kot agonist pozitivne kontrole,
 - 1 nM E2 + OHT (v treh ponovitvah).

Merila za razlago rezultatov

Opomba: vse jamice je treba tretirati z enako koncentracijo vehikla.

- Če na agonistično delovanje neznane kemikalije tretiranje z antagonistom ER NE vpliva, je razvrščena kot „negativna“.
- Če je agonistično delovanje neznane kemikalije popolnoma zavrto, uporabite merila za sprejetje odločitve.
- Če je agonistično delovanje pri najnižji koncentraciji najmanj enako odzivu PC10, je inhibicija neznane kemikalije najmanj enaka odzivu PC10. Izračuna se razlika v odzivih med netretiranimi in tretiranimi jamicami z antagonistom ER, to razliko pa je treba šteti za dejanski odziv in jo je treba uporabiti za izračun ustreznih parametrov, da se lahko sprejme odločitev o razvrstitvi.

Podatkovna analiza

Preverite standard izvajanja.

Preverite KV med jamicami, tretiranimi v enakih pogojih.

1. Izračunajte srednjo vrednost kontrole z vehiklom.
2. Srednjo vrednost kontrole z vehiklom odštejte od vrednosti za posamezno jamico, ki **ni** tretirana z OHT.
3. Izračunajte srednjo vrednost OHT.
4. Od vrednosti za posamezno jamico, tretirano z OHT, odštejte srednjo vrednost kontrole z vehiklom.
5. Izračunajte srednjo vrednost pozitivne kontrole.
6. Izračunajte relativno transkripcijsko aktivnost vseh drugih jamic glede na pozitivno kontrolo.

Dodatek 2.2

PRIPRAVA SERUMA, TRETIRANEGA Z OGLJEM, PREVLEČENIM Z DEKSTRANOM (DCC)

1. Tretiranje seruma z ogljem, prevlečenim z dekstranom (DCC), je splošna metoda za odstranitev estrogenih spojin iz seruma, ki se doda celičnemu gojišču, da se izključi izkrivljen odziv, povezan z ostanki estrogenov v serumu. S tem postopkom se lahko tretira 500 ml fetalnega seruma goveda (FBS).

Elementi

2. Potrebni so materiali in oprema, navedeni v nadaljevanju.

Materiali

Aktivno oglje

Dekstran

Magnezijev klorid heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)

Saharoza

1 M pufrske raztopine HEPES (pH 7,4)

Ultra čista voda, dobljena s filtrskim sistemom

Oprema

Avtoklavirana steklena posoda (velikost je treba ustrezno prilagoditi), običajna laboratorijska centrifuga (pri kateri se lahko temperatura nastavi na 4 °C)

Postopek

3. Naslednji postopek je prilagojen za uporabo 50-mililitrskih centrifugalnih epruvet.

[1. dan] Pripravite raztopino oglja, prevlečenega z dekstranom, z 1 l ultra čiste vode, ki vsebuje 1,5 mM MgCl_2 , 0,25 M saharoze, 2,5 g oglja, 0,25 g dekstrana in 5 mM HEPES, ter jo čez noč mešajte pri 4 °C.

[2. dan] Raztopino odmerite v 50-mililitrske centrifugalne epruvete in 10 minut centrifugirajte pri 10 000 vrt./min pri 4 °C. Odstranite supernatant in polovico usedline oglja shranite pri 4 °C, da se bo uporabila tretji dan. Drugo polovico oglja raztopite s FBS, ki ste ga odtaljevali počasi, da se je preprečilo obarjanje, in 30 minut toplotno inaktivirali pri 56 °C, nato vse skupaj prestavite v avtoklavirano stekleno posodo, kot je erlenmajerica. To suspenzijo čez noč rahlo mešajte pri 4 °C.

[3. dan] Odmerite suspenzijo s FBS v centrifugalne epruvete za 10-minutno centrifugiranje pri 10 000 vrt./min pri 4 °C. Zberite FBS in ga prenesite na novo ogleno usedlino, pripravljeno in shranjeno drugi dan. Suspendirajte ogleno usedlino in to suspenzijo čez noč rahlo mešajte v avtoklavirani stekleni posodi pri 4 °C.

[4. dan] Odmerite suspenzijo za 10-minutno centrifugiranje pri 10 000 vrt./min. pri 4 °C in sterilizirajte supernatant s filtracijo skozi 0,2-mikrometrski sterilni filter. Ta FBS, tretiran z ogljem, prevlečenim z dekstranom (DCC), je treba hraniti pri -20 °C in porabiti v enem letu.

Dodatek 3

PRESKUS TRANSAKTIVACIJE ESTROGENSKEGA RECEPTORJA VM7LUC ZA OPREDELITEV AGONISTOV IN ANTAGONISTOV ESTROGENSKIH RECEPTORJEV

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

1. Pri tem preskusu se uporablja celična linija VM7Luc4E2 ⁽¹⁾. Validirala sta jo National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) in Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (1). Celične linije VM7Luc pretežno izražajo endogeno ER α in manjšo količino endogene ER β (2) (3) (4).
2. Ta preskus se uporablja za širok razpon snovi, če jih je mogoče raztopiti v dimetil sulfoksidu (DMSO; CASRN 67-68-5), ne reagirajo z DMSO ali gojiščem celičnih kultur in niso toksične pri koncentracijah, ki se preskušajo. Če uporaba DMSO ni mogoča, se lahko uporabi drug vehikel, kot je etanol ali voda (glej odstavke 12). Dokazana učinkovitost preskusa z (ant)agonistom VM7Luc ER TA nakazuje, da se lahko podatki, dobljeni s tem preskusom, uporabijo za z ER povzročene mehanizme delovanja in se lahko upoštevajo pri prednostnem razvrščanju snovi za nadaljnje preskušanje.
3. Ta preskus je izrecno namenjen zaznavi s hER α in hER β povzročene TA z merjenjem kemiluminiscence kot končne točke. Uporaba kemiluminiscence v bioloških preskusih je zelo razširjena, ker ima luminiscenca visoko razmerje med signalom in ozadjem. Vendar lahko aktivnost kresničkine luciferaze v celičnih preskusih motijo snovi, ki zavirajo luciferazni encim, kar povzroči bodisi očitno zaviranje bodisi povečano luminiscenco zaradi stabilizacije proteinov. Poleg tega se je pri nekaterih preskusih na luciferaznem poročevalskem genu ER poročalo o nereceptorsko povzročenih luminiscenčnih signalih pri koncentracijah fitoestrogena, višjih od 1 μ M, ki so se pojavili zaradi prevelike aktivacije luciferaznega poročevalskega gena (9) (11). Čeprav krivulja odziva na odmerek kaže, da do dejanske aktivacije sistema ER pride pri nižjih koncentracijah, je treba izražanje luciferaze, dobljeno pri visokih koncentracijah fitoestrogenov ali podobnih spojin, ki domnevno povzročajo fitoestrogeno podobno preveliko aktivacijo luciferaznega poročevalskega gena, pazljivo preučiti v sistemih preskusa ER TA s stabilno transfekcijo.
4. Pred uporabo tega preskusa za regulativne namene je treba prebrati oddelka 'SPLOŠNI UVOD' in 'ELEMENTI PRESKUSA ER TA'. Opredelitve pojmov in kratice, uporabljene pri tej preskusni metodi, so opisane v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

5. S tem preskusom se pokaže vezava liganda ER, ki ji sledi premestitev kompleksa receptor-ligand na jedro. V jedru se kompleks receptor-ligand veže na specifične odzivne elemente DNK in transaktivira poročevalski gen (*luc*), kar povzroči nastanek luciferaze in poznejše oddajanje svetlobe, kar je mogoče kvantificirati z luminometrom. Luciferazna aktivnost je mogoče hitro in poceni oceniti s številnimi kompleti, ki so na voljo na trgu. Pri VM7Luc ER TA se uporablja celična linija človeškega adenokarcinoma, odzivna na ER, tj. VM7, ki je bila stabilno transfecirana s konstruktom kresničkinega poročevalskega gena *luc* pod nadzorom štirih odzivnih elementov za estrogen nad promotorjem virusa tumorja mlečne žleze pri miši (MMTV) za zaznavo snovi z agonističnim ali antagonističnim

⁽¹⁾ Pred junijem 2016 se je ta celična linija imenovala BG1Luc. Celice BG-1 so prvotno opisali Geisinger *et al.* (1998) (12), pozneje pa so njihove lastnosti določili raziskovalci inštituta National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). Še ne tako daleč nazaj so odkrili, da obstajata dve varianti celic BG-1, ki ju uporabljajo raziskovalci, tj. BG-1 Fr in BG-1 NIEHS. Poglobljena analiza, vključno s testiranjem DNK, teh dveh variant celične linije BG-1, ki so jo izvedli Li in sodelavci (2014) (14), je pokazala, da je BG-1 Fr edinstvena in da BG-1 NIEHS, tj. prvotna celična linija, ki je bila uporabljena za razvoj preskusa, ni celična linija karcinoma jajčnikov pri človeku, tj. BG1, temveč je varianta celične linije raka dojke pri človeku, tj. MCF7. Celična linija, uporabljena v preskusu, ki se je prvotno imenovala BG1Luc4E2 (15), se bo zdaj imenovala VM7Luc4E2 ('V' = varianta; 'M7' = celice MCF7). Podobno se bo tudi preskus zdaj imenoval VM7Luc ER TA. Čeprav se s tem spremeni izvor celične linije, na kateri temelji preskus, to ne vpliva na objavljene validacijske študije niti na koristnost in uporabo tega preskusa za presejanje estrogenskih/antiestrogenskih kemikalij.

delovanjem ER *in vitro*. Ta promotor MMTV le šibko navzkrižno reagira z drugimi steroidnimi in nesteroidnimi hormoni (8). Merila za razlago podatkov so podrobno opisana v odstavku 41. Na kratko, pozitiven odziv se opredeli s krivuljo odziva na koncentracijo, ki vsebuje vsaj tri točke z vrsticami napak, ki se ne prekrivajo (srednja vrednost $\pm$ standardni odklon), in s spremembo amplitude (normalizirana relativna svetlobna enota (RLU)), ki znaša vsaj 20 % največje vrednosti za referenčni standard (17 β -estradiol (E2; CASRN 50-28-2) za preskus z agonistom, raloksifen HCl (Ral; CASRN 84449-90-1)/E2 za preskus z antagonistom).

POSTOPEK

Celična linija

6. Za preskus je treba uporabiti stabilno transfecirano celično linijo VM7Luc4E2. Celična linija je trenutno na voljo samo s tehničnim licenčnim sporazumom z univerzo University of California, Davis, Kalifornija, ZDA ⁽²⁾, in podjetjem Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, Severna Karolina, ZDA ⁽³⁾.

Stabilnost celične linije

7. Da se ohranita stabilnost in celovitost celične linije, je treba celice iz zamrznjene zaloge v vzdrževalnem gojišču gojiti več kot eno pasažo (glej odstavek 9). Celice se ne smejo gojiti več kot 30 pasaž. Za celično linijo VM7Luc4E2 30 pasaž pomeni približno tri mesece.

Pogoji gojenja celičnih kultur in nasaditve na plošče

8. Slediti je treba postopkom iz smernic za dobro prakso pri gojenju celic (5) (6), da se zagotovi kakovost vseh materialov in metod ter tako ohranijo celovitost, veljavnost in obnovljivost vsega opravljenega dela.
9. Celice VM7Luc4E2 se vzdržujejo v gojišču RPMI 1640 z dodanima 0,9-odstotno raztopino Pen-Strep in 8,0-odstotnim fetusnim serumom goveda (FBS) v namenskem inkubatorju za tkivne kulture pri 37 ± 1 °C, vlažnosti, ki znaša 90 ± 5 %, in $5,0 \pm 1$ % CO₂ v zraku.
10. Ko je dosežena ~ 80-odstotna konfluenta, se celice VM7Luc4E2 kultivirajo na novem gojišču in 48 ur kondicionirajo v okolju brez estrogena, preden se nasadijo na 96-jamične plošče, da se izpostavijo preskusnim kemikalijam in analizi indukcije luciferazne aktivnosti v odvisnosti od estrogena. Gojišče brez estrogena (EFM) vsebuje Dulbeccovo modificirano Eagleovo gojišče (DMEM) brez fenol rdečega, ki so mu dodani 4,5-odstotni FBS, tretiran z ogljem/dekstranom, 1,9-odstotni L-glutamin in 0,9-odstotna raztopina Pen-Strep. V plastičnih posodah ne sme biti estrogen-skega delovanja (glej podroben protokol (7)).

Merila za sprejemljivost

11. Sprejetje ali zavrnitev preskusa temelji na oceni rezultatov referenčnih standardov in kontrol za posamezni poskus, izveden na 96-jamični plošči. Vsak referenčni standard se preskusi pri več koncentracijah, prav tako je več vzorcev vsake referenčne in kontrolne koncentracije. Rezultati se primerjajo s kontrolami kakovosti za te parametre,

⁽²⁾ Michael S. Denison, Ph.D. profesor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, e-naslov: msdenison@ucdavis.edu, (530) 7548649.

⁽³⁾ Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, e-naslov: info@dioxins.com, telefon: 9196884804, telefaks: 9196884404.

izpeljanimi iz zbirk podatkov iz preteklih preskusov z agonisti in antagonisti, ki jih je vsak laboratorij ustvaril med dokazovanjem usposobljenosti. Zbirke podatkov iz preteklih preskusov se stalno posodablajo z vrednostmi referenčnih standardov in kontrol. Zaradi sprememb opreme ali laboratorijskih pogojev je morda treba ustvariti posodobljene zbirke podatkov iz preteklih preskusov.

Preskus z agonistom

Preskus za določanje območja

- Indukcija: indukcijo plošče je treba izmeriti tako, da se povprečna najvišja vrednost relativne svetlobne enote (RLU) za referenčni standard E2 deli s povprečno vrednostjo RLU za kontrolo z DMSO. Običajno je doseženo petkratno razmerje indukcije, vendar mora biti za namene sprejemljivosti razmerje indukcije najmanj štirikratno.
- Rezultati kontrole z DMSO: vrednosti RLU za kontrolo s topilom morajo biti znotraj 2,5-kratnika standardnega odklona od srednje vrednosti RLU za kontrolo s topilom iz preteklih preskusov.
- Poskus, ki ne izpolnjuje katerega od meril za sprejemljivost, je treba zavreči in ponoviti.

Celovit preskus

Vključuje merila za sprejemljivost iz preskusa za določanje območja z agonistom in naslednje:

- rezultate referenčnih standardov: krivulja odziva na koncentracijo za referenčni standard E2 mora imeti sigmoidno obliko in vsaj tri vrednosti znotraj linearnega dela krivulje odziva na koncentracijo.
- rezultate pozitivne kontrole: vrednosti RLU za kontrolo z metoksiklorom morajo biti višje od srednje vrednosti za DMSO, ki se ji prišteje trikratnik standardnega odklona od srednje vrednosti za DMSO.
- Poskus, ki ne izpolnjuje katerega koli od meril za sprejemljivost, je treba zavreči in ponoviti.

Preskus z antagonistom

Preskus za določanje območja

- Redukcija: redukcijo plošče se izmeri tako, da se povprečna najvišja vrednost RLU za referenčni standard Ral/E2 deli s povprečno vrednostjo RLU za kontrolo z DMSO. Običajno je doseženo petkratno razmerje redukcije, vendar mora biti za namene sprejemljivosti razmerje redukcije najmanj trikratno.
- Rezultati kontrole z E2: vrednosti RLU za kontrolo z E2 morajo biti znotraj 2,5-kratnika standardnega odklona od srednje vrednosti RLU za kontrolo z E2 iz preteklih preskusov.
- Rezultati kontrole z DMSO: vrednosti RLU za kontrolo z DMSO morajo biti znotraj 2,5-kratnika standardnega odklona od srednje vrednosti RLU za kontrolo s topilom iz preteklih preskusov.

- Poskus, ki ne izpolnjuje katerega koli od meril za sprejemljivost, je treba zavreči in ponoviti.

Celovit preskus

Vključuje merila za sprejemljivost iz preskusa za določanje območja z antagonistom in naslednje:

- rezultate referenčnih standardov: krivulja odziva na koncentracijo za referenčni standard Ral/E2 mora imeti sigmoidno obliko in vsaj tri vrednosti znotraj linearnega dela krivulje odziva na koncentracijo;
- rezultate pozitivne kontrole: vrednosti RLU za kontrolo s tamoksifenom/E2 morajo biti nižje od srednje vrednosti za kontrolo z E2, od katere se odšteje trikratnik standardnega odklona od srednje vrednosti za kontrolo z E2.
- Poskus, ki ne izpolnjuje katerega koli od meril za sprejemljivost, je treba zavreči in ponoviti.

Referenčni standardi, pozitivna kontrola in kontrola z vehiklom

Kontrola z vehiklom (preskusi z agonistom in antagonistom)

12. Vehikel, v katerem se raztopi preskusna kemikalija, je treba preskusiti kot kontrolo z vehiklom. Vehikel, ki je bil uporabljen med validacijo preskusa VM7Luc ER TA, je bil 1 vol. % dimetilsulfoksida (DMSO, CASRN 67-68-5) (glej odstavek 24). Če se uporabi drug vehikel, ne DMSO, je treba vse referenčne standarde, kontrole in preskusne kemikalije preskusiti v istem vehiklu, če je ustrezno.

Referenčni standard (določanje območja z agonistom)

13. Referenčni standard je E2 (CASRN 50-28-2). Pri preskušanju za določanje območja referenčni standard sestavlja zaporedno redčenje štirih koncentracij E2 ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ in $2,87 \times 10^{-12}$ M), pri čemer se vsaka koncentracija preskusi v po dveh jamicah.

Referenčni standard (celovit preskus z agonistom)

14. E2 za celovito preskušanje sestavlja zaporedno redčenje v razmerju 1: 2, ki vključuje 11 koncentracij (od $3,67 \times 10^{-10}$ do $3,59 \times 10^{-13}$ M) E2 v po dveh jamicah.

Referenčni standard (določanje območja z antagonistom)

15. Referenčni standard je kombinacija Ral (CASRN 84449-90-1) in E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 pri preskušanju za določanje območja obsega zaporedno redčenje treh koncentracij Ral ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$ in $1,92 \times 10^{-10}$ M) in fiksno koncentracijo ($9,18 \times 10^{-11}$ M) E2 v po dveh jamicah.

Referenčni standard (celovit preskus z antagonistom)

16. Ral/E2 za celovito preskušanje obsega zaporedno redčenje Ral v razmerju 1: 2 (od $2,45 \times 10^{-8}$ do $9,57 \times 10^{-11}$ M) in fiksno koncentracijo ($9,18 \times 10^{-11}$ M) E2, ki jo sestavlja devet koncentracij Ral/E2 v po dveh jamicah.

Šibka pozitivna kontrola (z agonistom)

17. Šibka pozitivna kontrola je $9,06 \times 10^{-6}$ M p,p'-metoksiklora (metoksiklor; CASRN 72-43-5) v EFM.

Šibka pozitivna kontrola (z antagonistom)

18. Šibko pozitivno kontrolo sestavlja tamoksifen (CASRN 10540-29-1) $3,36 \times 10^{-6}$ M z $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 v EFM.

Kontrola z E2 (samo preskus z antagonistom)

19. Kontrola z E2 je $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 v EFM in se uporablja kot osnovna negativna kontrola.

Razmerje indukcije (z agonistom)

20. Indukcija luciferazne aktivnosti referenčnega standarda (E2) se izmeri tako, da se povprečna najvišja vrednost RLU za referenčni standard E2 deli s povprečno vrednostjo RLU za kontrolo z DMSO, pri čemer mora biti rezultat večji od štirikratnega razmerja.

Razmerje redukcije (z antagonistom)

21. Srednja luciferazna aktivnost referenčnega standarda (Ral/E2) se izmeri tako, da se povprečna najvišja vrednost RLU za referenčni standard Ral/E2 deli s povprečno vrednostjo RLU za kontrolo z DMSO in mora biti večja od trikratnega razmerja.

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija (glej odstavek 14 ter preglednici 3 in 4 v oddelku 'ELEMENTI PRESKUSA ER TA' te preskusne metode)

Vehikel

22. Preskusne kemikalije je treba raztopiti v topilu, v katerem je topna zadevna preskusna kemikalija in ki se meša s celičnim gojiščem. Primerni vehikli so voda, etanol (od 95- do 100-odstotna čistost) in DMSO. Če se uporabi DMSO, raven ne sme preseči 1 vol. %. Za vsak vehikel je treba dokazati, da največja uporabljena količina ni citotoksična in ne moti učinkovitosti preskusa. Referenčni standardi in kontrole se raztopijo v 100-odstotnem topilu in nato razredčijo na ustrezne koncentracije v EFM.

Priprava preskusnih kemikalij

23. Preskusne kemikalije se raztopijo v 100-odstotnem DMSO (ali ustreznem topilu) in nato razredčijo na ustrezne koncentracije v EFM. Vse preskusne kemikalije je treba pustiti, da se uravnotežijo na sobno temperaturo, preden se raztopijo in razredčijo. Za vsak preskus je treba pripraviti sveže raztopine preskusnih kemikalij. Raztopine ne smejo imeti vidne oborine ali motnosti. Zaloge referenčnih standardov in kontrol se lahko pripravijo v večjih količinah; vendar je treba za vsak poskus pripraviti sveže končne referenčne standarde, kontrolne razredčine in preskusne kemikalije ter jih porabiti v 24 urah po pripravi.

Topnost in citotoksičnost: preudarki glede določanja območja

24. Preskušanje za določanje območja sestavljajo sedemtočkovne zaporedne razredčine v razmerju 1: 10, izvedene v dveh ponovitvah. Preskusne kemikalije se najprej preskusijo do največje koncentracije 1 mg/ml (~ 1 mM) za preskušanje z agonistom in 20 µg/ml (~ 10 µM) za preskušanje z antagonistom. S poskusi za določanje območja se določi naslednje:

- začetne koncentracije preskusnih kemikalij, ki jih je treba uporabiti pri celovitem preskušanju;
- razredčine preskusnih kemikalij (1: 2 ali 1: 5), ki jih je treba uporabiti pri celovitem preskušanju.

25. Ocena viabilnosti/citotoksičnosti celic je vključena v protokole preskusov z agonistom in antagonistom (7) ter je del preskušanja za določanje območja in celovitega preskušanja. Metoda citotoksičnosti, ki je bila uporabljena za oceno viabilnosti celic med validacijo VM7Luc ER TA (1), je bila postopna kvalitativna metoda vizualnega opazovanja; uporabi pa se lahko tudi kvantitativna metoda za ugotavljanje citotoksičnosti (glej protokol (7)). Podatkov iz koncentracij preskusnih kemikalij, ki povzročijo več kot 20-odstotno zmanjšanje viabilnosti, ni mogoče uporabiti.

Izpostavitev preskusni kemikaliji in razporeditev na preskusni plošči

26. Celice se preštejejo in nasadijo na 96-jamične plošče s tkivno kulturo (2×10^5 celic na jamico) v EFM ter 24 ur inkubirajo, da se lahko celice pritrdijo na ploščo. EFM se odstrani, nadomesti s preskusno in referenčno kemikalijo v EFM ter 19–24 ur inkubira. Posebni preudarki so potrebni pri snoveh, ki so zelo hlapne, saj lahko kontrolne jamice v bližini povzročijo lažno pozitivne rezultate. V takih primerih je mogoče s 'tesnili' za plošče med preskušanjem učinkovito izolirati posamezne jamice, zato je njihova uporaba priporočljiva.

Preskusi za določanje območja

27. Pri preskušanju za določanje območja se uporabijo vse jamice na 96-jamični plošči, da se preskusi do šest preskusnih kemikalij, in sicer kot sedemtočkovne zaporedne razredčine v razmerju 1: 10 v dveh ponovitvah (glej [sliki 1 in 2](#)).

- Pri preskušanju za določanje območja z *agonistom* se uporabijo štiri koncentracije E2 v dveh ponovitvah kot referenčni standard in štiri jamice s ponovljenimi vzorci za kontrolo z DMSO.
- Pri preskušanju za določanje območja z *antagonistom* se uporabijo tri koncentracije Ral/E2 z $9,18 \times 10^{-11}$ M v dveh ponovitvah kot referenčni standard in tri jamice s ponovljenimi vzorci za kontrole z E2 in DMSO.

Slika 1

Razporeditev na 96-jamični plošči pri preskusu za določanje območja z agonistom

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Kratice: od E2-1 do E2-4 = koncentracije referenčnega standarda E2 (od visoke do nizke); od TC1-1 do TC1-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 1 (TC1); od TC2-1 do TC2-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 2 (TC2); od TC3-1 do TC3-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 3 (TC3); od TC4-1 do TC4-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 4 (TC4); od TC5-1 do TC5-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 5 (TC5); od TC6-1 do TC6-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 6 (TC6); VC = kontrola z vehiklom (DMSO (1 vol. % EFM)).

Slika 2

Razporeditev na 96-jamični plošči pri preskusu za določanje območja z antagonistom

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Kratice: E2 = kontrola z E2; od Ral-1 do Ral-3 = koncentracije referenčnega standarda raloksifena/E2 (od visoke do nizke); od TC1-1 do TC1-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 1 (TC1); od TC2-1 do TC2-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 2 (TC2); od TC3-1 do TC3-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 3 (TC3); od TC4-1 do TC4-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 4 (TC4); od TC5-1 do TC5-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 5 (TC5); od TC6-1 do TC6-7 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 6 (TC6); VC = kontrola z vehiklom (DMSO (1 vol. % EFM)).

Opomba: vse preskusne kemikalije se preskusijo v prisotnosti $9,18 \times 10^{-11}$ M E2.

28. Priporočena končna količina gojišča, potrebna za vsako jamico, je 200 µl. Uporabljajte samo preskusne plošče, pri katerih je viabilnost celic v vseh jamicah vsaj 80-odstotna.

29. Določitev začetnih koncentracij za celovito preskušanje z **agonistom** je podrobno opisana v protokolu za preskus z agonistom (7). Na kratko, uporabijo se naslednja merila:

- če na krivulji koncentracije preskusne kemikalije ni točk nad srednjo vrednostjo, ki se ji prišteje trikratnik standardnega odklona kontrole z DMSO, se celovito preskušanje izvede z 11-točkovnim zaporednim redčenjem v razmerju 1: 2, ki se začne pri najvišji topni koncentraciji;
- če so na krivulji koncentracije preskusne kemikalije točke nad srednjo vrednostjo, ki se ji prišteje trikratnik standardnega odklona kontrole z DMSO, mora biti začetna koncentracija, ki se uporabi za 11-točkovno shemo redčenja pri celovitem preskušanju, za en logaritem višja od koncentracije, pri kateri se dobi najvišja prilagojena vrednost RLU pri določanju območja. 11-točkovna shema redčenja temelji na razredčinah v razmerju 1: 2 ali 1: 5 v skladu z naslednjimi merili:

11-točkovno zaporedno redčenje v razmerju 1: 2 je treba uporabiti, če dobljeno območje koncentracije zajema celoten razpon odzivov na podlagi krivulje odziva na koncentracijo, dobljene pri preskusu za določanje območja. V nasprotnem primeru uporabite redčenje v razmerju 1: 5;

- če ima preskusna kemikalija bifazno krivuljo odziva na koncentracijo pri preskusu za določanje območja, je treba obe fazi obravnavati tudi pri celovitem preskušanju.

30. Določitev začetnih koncentracij za celovito preskušanje z **antagonistom** je podrobno opisana v protokolu za preskus z antagonistom (7). Na kratko, uporabijo se naslednja merila:

- če na krivulji koncentracije preskusne kemikalije ni točk pod srednjo vrednostjo, od katere se odšteje trikratnik standardnega odklona kontrole z E2, se celovito preskušanje s kontrolo izvede z 11-točkovnim zaporednim redčenjem v razmerju 1: 2, ki se začne pri najvišji topni koncentraciji;

— če so na krivulji koncentracije preskusne kemikalije točke pod srednjo vrednostjo, od katere se odšteje trikratnik standardnega odklona kontrole z E2, mora biti začetna koncentracija, ki se uporabi za 11-točkovno shemo redčenja pri celovitem preskušanju, ena od naslednjih:

- koncentracija, s katero se dobi najnižja prilagojena vrednost RLU pri določanju območja;
- najvišja topna koncentracija (glej protokol za preskus z antagonistom (7), slika 14-2);
- najnižja citotoksična koncentracija (za podoben primer glej protokol za preskus z antagonistom (7), slika 14-3);

— 11-točkovna shema redčenja temelji na zaporednem redčenju v razmerju 1: 2 ali 1: 5 v skladu z naslednjimi merili:

11-točkovno zaporedno redčenje v razmerju 1: 2 je treba uporabiti, če dobljeno območje koncentracije zajema celoten razpon odzivov na podlagi krivulje odziva na koncentracijo, dobljene pri preskusu za določanje območja. V nasprotnem primeru je treba uporabiti redčenje v razmerju 1: 5.

Celoviti preskusi

31. Celovito preskušanje sestavljajo 11-točkovne zaporedne razredčitve (zaporedne razredčitve v razmerju 1: 2 ali 1: 5, odvisno od začetne koncentracije pri merilih za celovito preskušanje), pri čemer se vsaka koncentracija preskusi v treh jamicah na 96-jamični plošči (glej [sliki 3 in 4](#)).

- Pri preskušanju z *agonistom* se kot referenčni standard uporabi 11 koncentracij E2 v dveh ponovitvah. Na vsako ploščo se vključijo štiri jamice s ponovljenim vzorcem za kontrolo z DMSO in štiri jamice s ponovljenim vzorcem za kontrolo z metoksiklorom ($9,06 \times 10^{-6}$ M).
- Pri celovitem preskušanju z *antagonistom* se kot referenčni standard uporabi devet koncentracij Ral/E2 z $9,18 \times 10^{-11}$ M E2 v dveh ponovitvah skupaj s štirimi jamicami s ponovljenim vzorcem za kontrolo z E2 $9,18 \times 10^{-11}$ M, štirimi jamicami s ponovljenim vzorcem za kontrole z DMSO in štirimi jamicami s ponovljenim vzorcem za tamoksifen $3,36 \times 10^{-6}$ M.

Slika 3

Razporeditev na 96-jamični plošči pri celovitem preskusu z agonistom

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met

Kratice: od TC1-1 do TC1-11 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 1; od TC2-1 do TC2-11 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 2; od E2-1 do E2-11 = koncentracije referenčnega standarda E2 (od visoke do nizke); met = šibka pozitivna kontrola s p,p' metoksiklorom; VC = kontrola z vehiklom DMSO (1 vol. %) EFM.

Slika 4

Razporeditev na 96-jamični plošči pri celovitem preskusu z antagonistom

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Kratice: E2 = kontrola z E2; od Ral-1 do Ral-9 = koncentracije referenčnega standarda raloksifena/E2 (od visoke do nizke); tam = šibka pozitivna kontrola s tamoksifenom/E2; od TC1-1 do TC1-11 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 1 (TC1); od TC2-1 do TC2-11 = koncentracije (od visoke do nizke) preskusne kemikalije 2 (TC2); VC = kontrola z vehiklom (DMSO (1 vol. % EFM)).

Opomba: kot je bilo navedeno, vse referenčne in preskusne jamice vsebujejo fiksno koncentracijo E2 ($9,18 \times 10^{-11}$ M).

32. Ponovljene celovite preskuse za isto kemikalijo je treba izvesti na različne dneve, da se zagotovi neodvisnost. Izvesti je treba vsaj dva celovita preskusa. Če si rezultati preskusov nasprotujejo (npr. en preskus je pozitiven, drugi negativen) ali če je eden od preskusov neustrezen, je treba izvesti dodatni tretji preskus.

Merjenje luminiscence

33. Luminiscenca se meri v razponu od 300 do 650 nm z uporabo luminometra za injiciranje in programske opreme, s katero se uravnava injekcijski volumen in interval merjenja (7). Oddajanje svetlobe iz vsake jamice se izrazi kot RLU na jamico.

ANALIZA PODATKOV**Določanje EC_{50}/IC_{50}**

34. Vrednosti EC_{50} (srednja efektivna koncentracija preskusne snovi (agonisti)) in IC_{50} (srednja inhibicijska koncentracija preskusne snovi (antagonisti)) se določita na podlagi podatkov o odzivu na koncentracijo. Za preskusne kemikalije, ki so pozitivne pri eni ali več koncentracijah, se koncentracija preskusne kemikalije, ki povzroči srednji odziv (IC_{50} ali EC_{50}), izračuna z analizo Hillove funkcije ali ustrezno alternativo. Hillova funkcija je štiriparametrski logistični matematični model, pri katerem se koncentracija preskusne kemikalije poveže z odzivom (običajno s sigmoidno krivuljo), tako da se uporabi spodnja enačba:

$$Y = dno + \frac{(vrh - dno)}{1 + 10^{(\lg EC_{50} - X) \text{Hillov naklon}}}$$

pri čemer je:

Y= odziv (tj. RLU);

X= logaritem koncentracije;

dno= najmanjši odziv;

vrh = največji odziv;

$lg EC_{50}$ (ali $lg IC_{50}$) = logaritem X kot odzivni razpon na sredini med vrhom in dnom;

Hillov naklon = strmina krivulje.

Z modelom se izračuna najboljšo ujemanje za vrh in dno, Hillov naklon ter parametra IC_{50} in EC_{50} . Za izračun vrednosti EC_{50} in IC_{50} je treba uporabiti ustrezno statistično programsko opremo (npr. Graphpad Prism^R).

Določanje osamelcev

35. Dobra statistična presoja bi se lahko olajšala z vključitvijo (med drugim) Q-testa (glej protokola za preskuse z agonistom in antagonistom (7)) za določitev 'neuporabnih' jamic, ki se izključijo iz podatkovne analize.
36. Za ponovljene vzorce referenčnega standarda E2 (velikost vzorca: dva) se vsaka prilagojena vrednost RLU za ponovljeni vzorec pri dani koncentraciji E2 šteje za osamelec, če je njegova vrednost v zbirki podatkov iz preteklih preskusov za več kot 20 % nad prilagojeno vrednostjo RLU za zadevno koncentracijo ali več kot 20 % pod njo.

Zbiranje in prilagoditev podatkov luminometra za preskušanje z določanjem položaja

37. Neobdelane podatke iz luminometra je treba prenesti na predlogo preglednice, zasnovano za preskus. Ugotoviti je treba, ali obstajajo podatkovne točke osamelcev, ki jih je treba odstraniti. (Za parametre, ki se določijo pri analizi, glej merila za sprejemljivost preskusa.) Opraviti je treba v nadaljevanju navedene izračune.

Agonist

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom (VC) DMSO.
2. korak Srednjo vrednost kontrole z vehiklom DMSO odštejte od vrednosti za posamezno jamico, da normalizirate podatke.
3. korak Izračunajte srednjo vrednost razmerja indukcije za referenčni standard (E2).
4. korak Izračunajte srednjo vrednost EC_{50} za preskusne kemikalije.

Antagonist

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom DMSO.
2. korak Srednjo vrednost kontrole z vehiklom DMSO odštejte od vrednosti za posamezno jamico, da normalizirate podatke.
3. korak Izračunajte srednje razmerje indukcije za referenčni standard (R_{al}/E2).
4. korak Izračunajte srednjo vrednost za referenčni standard E2.
5. korak Izračunajte srednjo vrednost IC_{50} za preskusne kemikalije.

Zbiranje in prilagoditev podatkov luminometra za celovito preskušanje

38. Neobdelane podatke iz luminometra je treba prenesti na predlogo preglednice, zasnovano za preskus. Ugotoviti je treba, ali obstajajo podatkovne točke osamelcev, ki jih je treba odstraniti. (Za parametre, ki se določijo pri analizi, glej merila za sprejemljivost preskusa.) Opravijo se v nadaljevanju navedeni izračuni.

Agonist

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom DMSO.
2. korak Srednjo vrednost kontrole z vehiklom DMSO odštejte od vrednosti za posamezno jamico, da normalizirate podatke.
3. korak Izračunajte srednjo vrednost razmerja indukcije za referenčni standard (E2).
4. korak Izračunajte srednjo vrednost EC₅₀ za E2 in preskusne kemikalije.
5. korak Izračunajte prilagojeno srednjo vrednost RLU za metoksiklor.

Antagonist

1. korak Izračunajte srednjo vrednost za kontrolo z vehiklom DMSO.
2. korak Srednjo vrednost kontrole z vehiklom DMSO odštejte od vrednosti za posamezno jamico, da normalizirate podatke.
3. korak Izračunajte srednjo vrednost razmerja indukcije za referenčni standard (Ra/E2).
4. korak Izračunajte srednjo vrednost IC₅₀ za Ra/E2 in preskusne kemikalije.
5. korak Izračunajte prilagojeno srednjo vrednost RLU za tamoksifen.
6. korak Izračunajte srednjo vrednost za referenčni standard E2.

Merila za razlago rezultatov

39. VM7Luc ER TA naj bi se uporabil v okviru pristopa, ki temelji na zanesljivosti dokazov, za pomoč pri prednostnem razvrščanju snovi za preskušanje endokrinih motilcev *in vivo*. Del tega postopka prednostnega razvrščanja je razvrstitev preskusne kemikalije kot pozitivne ali negativne za delovanje agonista ali antagonista ER. Merila za pozitivno ali negativno odločitev, ki se uporabljajo v validacijski študiji VM7Luc ER TA, so opisana v preglednici 1.

Preglednica 1

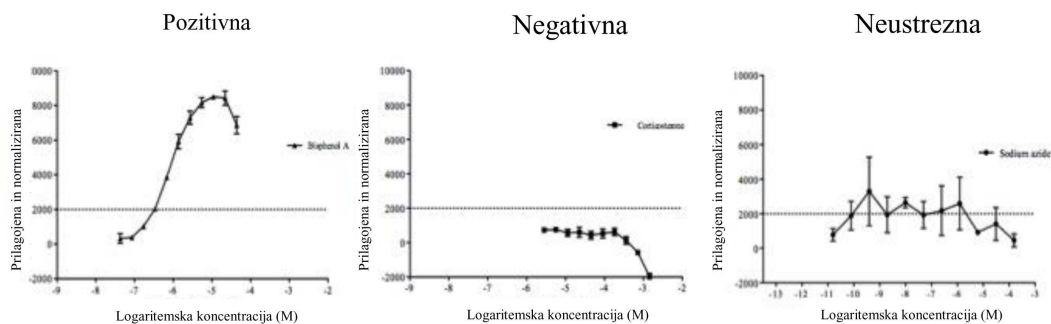
Merila za pozitivno ali negativno odločitev

AGONISTIČNO DELOVANJE	
Pozitivna	— Vse preskusne kemikalije, ki so razvrščene kot <i>pozitivne</i> za agonistično delovanje ER, morajo imeti krivuljo odziva na koncentracijo, ki jo sestavlja bazna linija, sledi ji pozitivni naklon, konča pa se s konstantno ravno ali vrhom. V nekaterih primerih se lahko opredelita samo dve od teh značilnosti (bazna linija in naklon ali naklon in vrh). — Linija, ki določa pozitivni naklon, mora vsebovati vsaj tri točke z vrsticami napak, ki se ne prekrivajo (srednja vrednost $\pm$ standardni odklon). Točke, ki sestavljajo bazno linijo, so izključene, lahko pa linearni del krivulje vključuje vrh ali prvo točko konstantne ravni. — Za pozitivno razvrstitev je potrebna amplituda odziva, tj. razlika med bazno linijo in vrhom, ki znaša vsaj 20 % najvišje vrednosti za referenčni standard E2 (tj. 2 000 RLU ali več, ko je najvišja vrednost odziva referenčnih standardov [E2] prilagojena na 10 000 RLU). — Če je mogoče, je treba vrednost EC_{50} izračunati za vsako pozitivno preskusno kemikalijo.
Negativna	Povprečna prilagojena RLU za dano koncentracijo je največ enaka srednji vrednosti RLU za kontrolo z DMSO, ki se ji prišteje trikratnik standardnega odklona RLU za DMSO.
Neustrezna	Podatki, ki jih ni mogoče razlagati kot veljavne, ker kažejo bodisi prisotnost ali odsotnost delovanja zaradi večjih kvalitativnih ali kvantitativnih omejitev, se štejejo za neustrezne in jih ni mogoče uporabiti za določitev, ali je preskusna kemikalija pozitivna ali negativna. Kemikalijo je treba znova preskusiti.
ANTAGONISTIČNO DELOVANJE	
Pozitivna	— Podatki o preskusni kemikaliji dajejo krivuljo odziva na koncentracijo, ki jo sestavlja bazna linija, tej pa sledi negativni naklon. — Linija, ki določa negativni naklon, mora vsebovati vsaj tri točke z vrsticami napak, ki se ne prekrivajo; točke, ki sestavljajo bazno linijo, so izključene, lahko pa linearni del krivulje vključuje prvo točko konstantne ravni. — Delovanje se mora zmanjšati vsaj za 20 % glede na najvišjo vrednost za referenčni standard Ral/E2 (tj. 8 000 RLU ali manj, ko je najvišja vrednost odziva referenčnega standarda [Ral/E2] prilagojena na 10 000 RLU). — Najvišje necitotoksične koncentracije preskusne kemikalije lahko znašajo največ 1×10^{-5} M. — Če je mogoče, je treba vrednost IC_{50} izračunati za vsako pozitivno preskusno kemikalijo.
Negativna	Pri koncentracijah, nižjih od $1,0 \times 10^{-5}$ M, so vse podatkovne točke nad vrednostjo EC_{80} (80 % odziva E2 ali 8 000 RLU).
Neustrezna	Podatki, ki jih ni mogoče razlagati kot veljavne, ker kažejo bodisi prisotnost ali odsotnost delovanja zaradi večjih kvalitativnih ali kvantitativnih omejitev, se štejejo za neustrezne in jih ni mogoče uporabiti za določitev, ali je preskusna kemikalija pozitivna ali negativna. Kemikalijo je treba znova preskusiti.

40. Za pozitivne rezultate sta značilni velikost učinka in koncentracija, pri kateri se pojavi učinek, če je mogoče. Primeri pozitivnih, negativnih in neustreznih podatkov so prikazani na slikah 5 in 6.

Slika 5

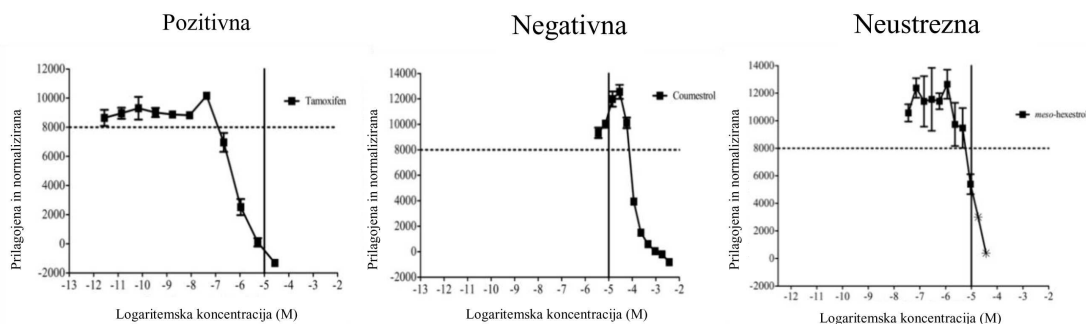
Primeri agonistov: pozitivni, negativni in neustrezni podatki



Črtna črta ponazarja 20 % odziva E2, 2 000 prilagojenih in normaliziranih RLU.

Slika 6

Primeri antagonistov: pozitivni, negativni in neustrezni podatki



Črtna črta ponazarja 80 % odziva Ral/E2, 8 000 prilagojenih in normaliziranih RLU.

Neprekinjena črta ponazarja $1,00 \times 10^{-5}$ M. Da se odziv šteje za pozitiven, mora biti pod črto za 8 000 RLU in pri koncentracijah, nižjih od $1,00 \times 10^{-5}$ M.

Koncentracije z zvezdico na grafu mezo-heksestrola ponazarjajo rezultate viabilnosti '2' ali več.

Rezultati preskusa za mezo-heksestrol se štejejo za neustrezne podatke, ker se edini odziv, ki je pod 8 000 RLU, pojavi pri $1,00 \times 10^{-5}$ M.

41. Izračuni EC_{50} in IC_{50} se lahko opravijo z uporabo štiriparametrске Hillove funkcije (za več podrobnosti glej protokol za preskus z agonistom in protokol za preskus z antagonistom (7)). Izpolnjevanje meril za sprejemljivost kaže, da sistem deluje pravilno, vendar ne zagotavlja, da bodo pri vsaki posamezni ponovitvi preskusa dobljeni točni podatki. Najboljše zagotovilo, da so bili dobljeni točni podatki, je podvojitve rezultatov prve ponovitve (glej odstavek 19 'ELEMENTI PRESKUSA ER TA').

POROČILO O PRESKUSU

42. Glej odstavek 20 'ELEMENTI PRESKUSA TA ER'.

VIRI

- (1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, *J. Cell Biochem.*, 82(3): 467-479.
- (3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58(23): 5367-5373.
- (4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β , a Modulator of ER α in the Uterus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 936-5941.
- (5) Balls, M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), *ALTEX*, 23 (Suppl): str. 270-273.
- (6) Coecke, S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33: str. 261-287.
- (7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication št. 11-7850.
- (8) Rogers, J. M., in Denison, M. S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro Mol. Toxicol.*, 13(1): 67-82.
- (9) Escande, A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10): 1459-69.
- (10) Thorne, N., Inglese, J., in Auld, D. S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology*, 17(6): 646-57.
- (11) Kuiper, G. G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinology*, 139(10): 4252-63.

-
- (12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280–288.
- (13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649–654.
- (14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072–2081.
- (15) Rogers, J. M., in Denison, M. S. (2000). Development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67–82.

Dodatek 4

PRESKUS TRANSAKTIVACIJE ČLOVEŠKEGA ESTROGENSKEGA RECEPTORJA-A S STABILNO TRANSFEKCIJO ZA ZAZNAVO ESTROGENSKEGA AGONISTIČNEGA IN ANTAGONISTIČNEGA DELOVANJA KEMIKALIJ Z UPORABO CELIČNE LINIJE ERα CALUX

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

1. Pri preskusu transaktivacije ERα CALUX se človeška celična linija U2OS uporablja za zaznavo estrogenskega agonističnega in antagonističnega delovanja, povzročenega s človeškim estrogenskim receptorjem alfa (hERα). Validacijska študija biološkega preskusa stabilne transfekcije ERα CALUX, ki jo je opravilo podjetje BioDetection Systems BV (Amsterdam, Nizozemska), je pokazala ustreznost in zanesljivost preskusa za predvideni namen (1). Celična linija ERα CALUX izraža samo stabilno transfecirano človeško ERα (2) (3).
2. Ta preskus je izrecno namenjen zaznavi s hERα povzročene transaktivacije z merjenjem bioluminiscence kot končne točke. Bioluminiscenca se pogosto uporablja pri bioloških preskusih zaradi visokega razmerja signal/šum (4).
3. Za koncentracije fitoestrogena, višje od 1 μM, se je poročalo, da preveč aktivirajo luciferazni poročevalski gen, posledica tega pa je nereceptorsko povzročena luminiscenca (5) (6) (7). Zato je treba višje koncentracije fitoestrogenov ali drugih podobnih spojin, ki lahko preveč aktivirajo izražanje luciferaze, pri preskusih transaktivacije ER s stabilno transfekcijo skrbno preučiti (glej Dodatek 2).
4. Pred uporabo tega preskusa za regulativne namene je treba prebrati oddelka 'SPLOŠNI UVOD' in 'ELEMENTI PRESKUSA ER TA'. Opredelitve pojmov in kratice, uporabljene pri tej preskusni metodi, so opisane v Dodatku 1.

NAČELO PRESKUSA (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

5. Biološki preskus se uporablja za oceno vezave liganda ER in poznejše premestitve kompleksa receptor-ligand na jedro. V jedru se kompleks receptor-ligand veže na specifične odzivne elemente DNK in transaktivira kresničkin luciferazni poročevalski gen, kar povzroči povečano celično izražanje luciferaznega encima. Po dodajanju luciferaznega substrata luciferina se luciferin pretvori v bioluminiscentni produkt. Proizvedeno svetlobo je mogoče zlahka zaznati in kvantificirati z luminometrom.
6. Pri preskusnem sistemu se uporabljajo stabilno transfecirane celice ERα CALUX. Celice ERα CALUX so izvirale iz celične linije človeškega osteoblastičnega osteosarkoma U2OS. Človeške celice U2OS so bile stabilno transfecirane s 3xHRE-TATA-Luc in pSG5-neo-hERα z uporabo metode koprecipitacije kalcijevega fosfata. Celična linija U2OS je bila izbrana kot najprimernejša za uporabo kot na estrogen (in drug steroidni hormon) odzivna poročevalska celična linija na podlagi opažanja, da je celična linija U2OS pokazala malo ali nič endogenega receptorskega delovanja. Neobstoje endogenih receptorjev je bil ocenjen samo z uporabo plazmidov luciferaznega poročevalskega gena, pri katerih dodajanje receptorskih ligandov ni pokazalo nikakršnega delovanja. Poleg tega je ta celična linija podprla močne s hormoni povzročene odzive, ko so bili prehodno uvedeni sorodni receptorji (2) (3) (8).
7. Preskušanje estrogenskega ali antiestrogenskega delovanja kemikalij z uporabo celične linije ERα CALUX vključuje predhodno presejalno ponovitev in celovite ponovitve. Med predhodno presejalno ponovitvijo se določijo topnost, citotoksičnost in izpopolnjeno območje koncentracije preskusnih kemikalij za celovito preskušanje. Med celovitimi ponovitvami se izpopolnjena območja koncentracije preskusnih kemikalij preskusijo v bioloških preskusih ERα CALUX, ki jim sledi razvrstitev preskusnih kemikalij glede na agonizem ali antagonizem.

8. Merila za razlago podatkov so podrobno opisana v odstavku 59. Na kratko, preskusna kemikalija se šteje za pozitivno za agonizem, če se pri vsaj dveh zaporednih koncentracijah preskusne kemikalije pokaže odziv, ki znaša najmanj 10 % največjega odziva referenčnega standarda 17 β -estradiola (PC₁₀). Preskusna kemikalija se šteje za pozitivno za antagonizem, če se pri vsaj dveh zaporednih koncentracijah preskusne kemikalije pokaže odziv, ki znaša največ 80 % največjega odziva referenčnega standarda tamoksifena (PC₈₀).

POSTOPEK

Celične linije

9. Za preskus je treba uporabiti stabilno transfecirano celično linijo U2OS ER α CALUX. S tehničnim licenčnim sporazumom jo je mogoče dobiti od podjetja BioDetection Systems BV, Amsterdam, Nizozemska.
10. Uporabijo se lahko samo celične kulture brez mikoplazme. Uporabljene serije celic morajo biti bodisi potrjeno negativne za okužbo z mikoplazmo bodisi je treba pred uporabo izvesti test za mikoplazmo. Za občutljivo zaznavo okužbe z mikoplazmo je treba uporabiti RT-PCR (verižna reakcija s polimerazo v realnem času) (9).

Stabilnost celične linije

11. Da se ohranita stabilnost in celovitost celic CALUX, jih je treba hraniti v tekočem dušiku (–80 °C). Po odtajanju celic za začetek gojenja nove kulture je treba celice vsaj dvakrat presaditi na novo gojišče, preden se uporabijo za oceno estrogenskega agonističnega ali antagonističnega delovanja kemikalij. Za presaditev na novo gojišče se lahko uporabi največ 30 pasaž.
12. Za spremljanje stabilnosti celične linije v daljšem časovnem obdobju je treba preveriti odzivnost sistema preskušanja z agonistom in antagonistom, tako da se oceni EC₅₀ ali IC₅₀ referenčnega standarda. Poleg tega je treba spremljati relativno indukcijo vzorca pozitivne kontrole (PC) in vzorca negativne kontrole (NC). Rezultati se morajo ujemati z merili za sprejemljivost biološkega preskusa z agonistom (preglednica 3C) ali antagonistom ER α CALUX (preglednica 4C). Referenčni standardi ter pozitivne in negativne kontrole so navedeni v preglednicah 1 in 2 za agonistični oziroma antagonistični način.

Pogoji gojenja celičnih kultur in nasaditve na plošče

13. Celice U2OS je treba kultivirati v gojišču (medij DMEM/F12 (1: 1) s fenol rdečim kot indikatorjem pH, ki so mu dodani fetusni serum goveda (7,5 %), neesencialne aminokisline (1 %), 10 enot/ml penicilina, streptomicina in geneticina (G-418) kot selektivni označevalec). Celice je treba namestiti v inkubator s CO₂ (5 % CO₂) pri 37 °C in 100-odstotni vlažnosti. Ko celice dosežejo 85–95-odstotno konfluenco, jih je treba kultivirati v novem gojišču ali pripraviti za nasaditev na 96-jamične mikrotitrne plošče. V zadnjenavedenem primeru je treba celice resuspendirati pri 1 $\times$ 10⁵ celic/ml v preskusnem mediju brez estrogena (medij DMEM/F12 (1: 1) brez fenol rdečega, ki so mu dodani fetusni serum goveda, tretiran z ogljem, prevlečenim z dekstranom (5 vol. %), neesencialne aminokisline (1 vol. %) ter 10 enot/ml penicilina in streptomicina) in jih nasaditi na 96-jamične mikrotitrne plošče (100 μ l homogenizirane celične suspenzije). Celice je treba 24 ur pred izpostavitvijo namestiti v inkubator s CO₂ (5 % CO₂, 37 °C in 100-odstotna vlažnost). Plastična oprema mora biti brez estrogena.

Merila za sprejemljivost

14. Agonistično in antagonistično delovanje preskusnih kemikalij se preskusita v preskusnih serijah. Preskusno serijo sestavlja največ 6 mikrotitrskih plošč. Vsaka preskusna serija vsebuje vsaj eno celotno serijo razredčin referenčnega standarda, pozitivni kontrolni vzorec, negativni kontrolni vzorec in kontrolo s topilom. Na slikah 1 in 2 je prikazana priprava plošče za serijo agonističnih in antagonističnih preskusov.

15. Vsako razredčino referenčnih standardov, preskusnih kemikalij, vseh kontrol s topilom ter pozitivnih in negativnih kontrol je treba analizirati v treh ponovitvah. Vsaka analiza treh ponovitev mora izpolnjevati zahteve iz preglednic 3A in 4A.
16. Celotna serija razredčin referenčnega standarda (17 β -estradiola za agonizem; tamoksifen za antagonizem) se pri vsaki preskusni seriji meri na prvi plošči. Da se omogoči primerjava rezultatov analize preostalih 5 mikrotitrskih plošč s prvo mikrotitrsko ploščo, ki vsebuje celotno krivuljo odziva na koncentracijo za referenčni standard, morajo vse plošče vsebovati 3 kontrolne vzorce: kontrolo s topilom, najvišjo preskušeno koncentracijo referenčnega standarda in približno koncentracijo EC₅₀ (agonizem) ali IC₅₀ (antagonizem) referenčnega standarda. Delež povprečnih kontrolnih vzorcev na prvi plošči in preostalih 5 ploščah mora izpolnjevati zahteve, kot so navedene v preglednici 3C (agonizem) ali preglednici 4C (antagonizem).
17. Za vsako od mikrotitrskih plošč v preskusni seriji se izračuna z-faktor (10). Z-faktor je treba izračunati z uporabo odzivov pri najvišji in najnižji koncentraciji referenčnega standarda. Mikrotitrsko plošča se šteje za veljavno, če izpolnjuje zahteve, kot so navedene v preglednici 3C (agonizem) ali preglednici 4C (antagonizem).
18. Referenčni standard mora prikazovati sigmoidno krivuljo odziva na odmere. EC₅₀ ali IC₅₀, izpeljan iz odziva serije razredčin referenčnega standarda, mora izpolnjevati zahteve, kot so navedene v preglednici 3C (agonizem) ali preglednici 4C (antagonizem).
19. Vsaka preskusna serija mora vsebovati pozitiven in negativen kontrolni vzorec. Izračunana relativna indukcija pozitivnega in negativnega kontrolnega vzorca mora izpolnjevati zahteve, kot so navedene v preglednici 3C (agonizem) ali preglednici 4C (antagonizem).
20. Med vsemi meritvami je treba indukcijski faktor najvišje koncentracije referenčnega standarda meriti tako, da se povprečni največji odziv relativne svetlobne enote (RLU) referenčnega standarda 17 β -estradiola deli s povprečnim odzivom RLU referenčne kontrole s topilom. Ta indukcijski faktor mora izpolnjevati minimalne zahteve za razmerje indukcije, kot so navedene v preglednici 3C (agonizem) ali preglednici 4C (antagonizem).
21. Samo mikrotitrške plošče, ki izpolnjujejo vsa zgoraj navedena merila za sprejemljivost, se lahko štejejo za veljavne in se lahko uporabijo za oceno odziva preskusnih kemikalij.
22. Merila za sprejemljivost se uporabljajo za predhodne presejalne ponovitve in celovite ponovitve.

Preglednica 1

Koncentracije referenčnega standarda, pozitivne kontrole (PC) in negativne kontrole (NC) za agonistični biološki preskus CALUX

	Snov	Št. CAS	Razpon preskusa (M)
Referenčni standard	17 β -estradiol	50-28-2	od $1 \cdot 10^{-13}$ do $1 \cdot 10^{-10}$
Pozitivna kontrola (PC)	17 α -metiltestosteron	58-18-4	$3 \cdot 10^{-6}$
Negativna kontrola (NC)	kortikosteron	50-22-6	$1 \cdot 10^{-8}$

Preglednica 2

Koncentracije referenčnega standarda, pozitivne kontrole (PC) in negativne kontrole (NC) za antagonistični biološki preskus CALUX

	Snov	Št. CAS	Razpon preskusa (M)
Referenčni standard	tamoksifen	10540-29-1	od $3 \cdot 10^{-9}$ do $1 \cdot 10^{-5}$
Pozitivna kontrola (PC)	4-hidroksitamoksifen	68047-06-3	$1 \cdot 10^{-9}$
Negativna kontrola (NC)	resveratrol	501-36-0	$1 \cdot 10^{-5}$

Preglednica 3

Merila za sprejemljivost agonističnega biološkega preskusa ER α CALUX

A – posamezni vzorci na plošči		Merilo
1	Največji delež SO treh jamic (za negativno kontrolo, pozitivno kontrolo, vsako razredčino preskusne kemikalije in referenčnega standarda, razen C0)	< 15 %
2	Največji delež SO treh jamic (za referenčni standard in kontrole preskusne kemikalije s topilom (C0, kontrola s topilom))	< 30 %
3	Največje uhajanje LDH kot merilo citotoksičnosti	< 120 %
B – na posamezni mikrotitrski plošči		
4	Razmerje med kontrolo referenčnega standarda s topilom (C0; plošča 1) in kontrolo preskusne kemikalije s topilom (kontrola s topilom; plošče 2 do x)	od 0,5 do 2,0
5	Razmerje med pribl. EC50 in najvišjimi koncentracijami referenčnega standarda na plošči 1 ter pribl. EC50 in najvišjimi koncentracijami referenčnega standarda na ploščah 2 do x (C4, C8)	od 0,70 do 1,30
6	Z-faktor za vsako ploščo	> 0,6
C – v posamezni seriji analiz (vse plošče v eni seriji)		
7	Sigmoidna krivulja referenčnega standarda	da (17 β -estradiol)
8	Referenčni standard 17 β -estradiol v območju EC50	od $4 \cdot 10^{-12}$ do $4 \cdot 10^{-11}$ M
9	Najnižje razmerje indukcije najvišje koncentracije 17 β -estradiola glede na kontrolo referenčnega standarda s topilom	5
10	Relativna indukcija (%) pozitivne kontrole	> 30 %
11	Relativna indukcija (%) negativne kontrole	< 10 %

Pribl.: približno; PC: pozitivna kontrola; NC: negativna kontrola; SC: kontrola preskusne kemikalije s topilom; C0: kontrola referenčnega standarda s topilom; SO: standardni odklon; LDH: laktat dehidrogenaza.

Preglednica 4

Merila za sprejemljivost antagonističnega biološkega preskusa ERα CALUX

A – posamezni vzorci na plošči		Merilo
1	Največji delež SO treh jamic (za negativno kontrolo, pozitivno kontrolo, vsako razredčino preskusne kemikalije in referenčnega standarda, kontrolo s topilom (C0))	< 15 %
2	Največji delež SO treh jamic (za kontrolo z vehiklom (VC) in najvišjo koncentracijo referenčnega standarda (C8))	< 30 %
3	Največje uhajanje LDH kot merilo citotoksičnosti	< 120 %
B – na posamezni mikrotitrski plošči		
4	Razmerje med kontrolo referenčnega standarda s topilom (C0; plošča 1) in kontrolo preskusne kemikalije s topilom (kontrola s topilom; plošče 2 do x)	od 0,70 do 1,30
5	Razmerje med pribl. IC ₅₀ koncentracij referenčnega standarda na plošči 1 in pribl. EC ₅₀ koncentracij referenčnega standarda na ploščah 2 do x (C4)	od 0,70 do 1,30
6	Razmerje med najvišjimi koncentracijami referenčnega standarda na plošči 1 in najvišjimi koncentracijami referenčnega standarda na ploščah 2 do x (C8)	od 0,50 do 2,0
7	Z-faktor za vsako ploščo	> 0,6
C – v posamezni seriji analiz (vse plošče v eni seriji)		
8	Sigmoidna krivulja referenčnega standarda	da (tamoksifen)
9	Območje IC ₅₀ referenčnega standarda (tamoksifen)	od $1 \cdot 10^{-8}$ do $1 \cdot 10^{-7}$ M
10	Najnižje razmerje indukcije kontrole referenčnega standarda s topilom glede na najvišjo koncentracijo tamoksifena	2,5
11	Relativna indukcija (%) pozitivne kontrole	< 70 %
12	Relativna indukcija (%) negativne kontrole	> 85 %

Pribl.: približno; PC: pozitivna kontrola; NC: negativna kontrola; VC: kontrola z vehiklom (kontrola s topilom brez fiksne koncentracije agonističnega referenčnega standarda); SC: kontrola preskusne kemikalije s topilom; C0: kontrola referenčnega standarda s topilom; SO: standardni odklon; LDH: laktat dehidrogenaza.

Kontrola s topilom/vehiklom, referenčni standardi, pozitivne kontrole, negativne kontrole

23. Tako za predhodno presejalno ponovitev kot za celovite ponovitve je treba uporabiti iste kontrole s topilom/vehiklom, referenčne standarde, pozitivne kontrole in negativne kontrole. Poleg tega morajo biti koncentracije referenčnih standardov, pozitivnih kontrol in negativnih kontrol enake.

Kontrola s topilom

24. Topilo, ki se uporabi za raztopitev preskusne kemikalije, je treba preskusiti kot kontrolo s topilom. Kot vehikel je bil med validacijo biološkega preskusa ER α CALUX uporabljen dimetilsulfoksid (DMSO, 1 vol. %; CASRN 67-68-5). Če se uporabi drugo topilo, ne DMSO, je treba vse referenčne standarde, kontrole in preskusne kemikalije preskusiti v istem vehiklu. Upoštevati je treba, da kontrola s topilom za antagonistične študije vsebuje fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17 β -estradiola (približno koncentracija EC₅₀). Za preskušanje topila, uporabljenega za antagonistične študije, je treba pripraviti in preskusiti kontrolo z vehiklom.

Kontrola z vehiklom (antagonizem)

25. Za preskušanje antagonizma se preskusnemu mediju doda fiksna koncentracija agonističnega referenčnega standarda 17 β -estradiola (približno koncentracija EC₅₀). Za preskus topila, uporabljenega za raztopitev preskusnih kemikalij za antagonizem, je treba pripraviti preskusni medij brez fiksne koncentracije agonističnega referenčnega standarda 17 β -estradiola. Ta kontrolni vzorec se označi kot kontrola z vehiklom. Kot vehikel je bil med validacijo biološkega preskusa ER α CALUX uporabljen dimetilsulfoksid (DMSO, 1 vol. %; CASRN 67-68-5). Če se uporabi drugo topilo, ne DMSO, je treba vse referenčne standarde, kontrole in preskusne kemikalije preskusiti v istem vehiklu.

Referenčni standardi

26. Agonistični referenčni standard je 17 β -estradiol (preglednica 1). Referenčni standardi obsegajo serijo razredčin osmih koncentracij 17 β -estradiola (1×10^{-13} , 3×10^{-13} , 1×10^{-12} , 3×10^{-12} , 6×10^{-12} , 1×10^{-11} , 3×10^{-11} , 1×10^{-10} M).
27. Antagonistični referenčni standard je tamoksifen (preglednica 2). Referenčni standardi obsegajo serijo razredčin osmih koncentracij tamoksifena (3×10^{-9} , 1×10^{-8} , 3×10^{-8} , 1×10^{-7} , 3×10^{-7} , 1×10^{-6} , 3×10^{-6} , 1×10^{-5} M). Vsaka od koncentracij antagonističnega referenčnega standarda se koinkubira s fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17 β -estradiola (3×10^{-12} M).

Pozitivna kontrola

28. Pozitivna kontrola za agonistične študije je 17 α -metiltestosteron (preglednica 1).
29. Pozitivna kontrola za antagonistične študije je 4-hidroksitamoksifen (preglednica 2). Antagonistična pozitivna kontrola se koinkubira s fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17 β -estradiola (3×10^{-12} M).

Negativna kontrola

30. Negativna kontrola za agonistične študije je kortikosteron (preglednica 1).
31. Negativna kontrola za antagonistične študije je resveratrol (preglednica 2). Antagonistična negativna kontrola se koinkubira s fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17 β -estradiola (3×10^{-12} M).

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija (glej odstavek 14 ter preglednici 3 in 4 v oddelku „ELEMENTI PRESKUSA ER TA“ te preskusne metode)

Vehikel

32. Topilo, ki se uporabi za raztapljanje preskusnih kemikalij, mora preskusno kemikalijo raztopiti v celoti in se mešati s celičnim gojiščem. Primerna topila so DMSO, voda in etanol (od 95- do 100-odstotna čistost). Če se kot topilo uporabi DMSO, največja koncentracija DMSO med inkubacijo ne sme preseči 1 vol. %. Pred uporabo je treba topilo preskusiti, da ni citotoksično in ne moti učinkovitosti preskusov.

Priprava referenčnih standardov, pozitivnih kontrol, negativnih kontrol in preskusnih kemikalij

33. Referenčni standardi, pozitivne kontrole, negativne kontrole in preskusne kemikalije se raztopijo v 100-odstotnem DMSO (ali ustreznem topilu). Nato je treba v istem topilu pripraviti ustrezne (zaporedne) razredčine. Preden se snovi raztopijo, je treba vse pustiti, da se prilagodijo na sobno temperaturo. Sveže pripravljene osnovne raztopine referenčnih standardov, pozitivnih kontrol, negativnih kontrol in preskusnih kemikalij ne smejo imeti vidne oborine ali motnosti. Zaloge referenčnih standardov in kontrol se lahko pripravijo v večjih količinah. Pred vsakim poskusom je treba pripraviti sveže osnovne raztopine preskusnih kemikalij. Za vsak poskus je treba pripraviti sveže končne razredčine referenčnih standardov, pozitivnih kontrol, negativnih kontrol in preskusnih kemikalij ter jih porabiti v 24 urah po pripravi.

Topnost, citotoksičnost in določanje območja

34. Med predhodno presejalno ponovitvijo se določi topnost preskusnih kemikalij v izbranem topilu. Pripravi se najvišja osnovna koncentracija, ki znaša 0,1 M. Če se pri tej koncentraciji pokažejo težave s topnostjo, je treba pripraviti nižje osnovne raztopine, dokler niso preskusne kemikalije v celoti raztopljene. Med predhodno presejalno ponovitvijo se preskusijo zaporedne razredčine preskusne kemikalije v razmerju 1: 10. Najvišja preskusna koncentracija za preskušanje z agonistom in antagonistom je 1 mM. Po predhodnem presejalnem pregledu se izpelje ustrezno izpopolnjeno območje koncentracije za preskusne kemikalije, ki ga je treba preskusiti med celovitimi ponovitvami. Razredčine, uporabljene za celovito preskušanje, morajo znašati 1-, 3-, 10-, 30-, 100-, 300-, 1000- in 3000-kratnik koncentracije.
35. Preskušanje citotoksičnosti je vključeno v protokole preskusov z agonistom in antagonistom (11). Preskušanje citotoksičnosti je del predhodne presejalne ponovitve in celovitih ponovitev. Metoda, uporabljena za oceno citotoksičnosti med validacijo biološkega preskusa ERα CALUX, je bil preskus uhanja laktata dehidrogenaze (LDH) v kombinaciji s kvalitativnim vizualnim pregledom celic (glej Dodatek 4.1) po izpostavitvi preskusnim kemikalijam. Vendar se lahko uporabijo tudi druge kvantitativne metode za določitev citotoksičnosti (npr. tetrazolijev kolorimetrični preskus (MTT) ali biološki preskus citotoksičnosti CALUX). Na splošno se koncentracije preskusnih kemikalij, pri katerih se kaže več kot 20-odstotno zmanjšanje viabilnosti celic, štejejo za citotoksične in jih zato ni mogoče uporabiti za oceno podatkov. Kar zadeva preskus uhanja LDH, se koncentracija preskusne kemikalije šteje za citotoksično, če delež uhanja LDH presega 120 %.

Izpostavitve preskusni kemikaliji in razporeditev na preskusni plošči

36. Po tripsinizaciji konfluentne bučke z gojenimi celicami se celice resuspendirajo pri 1×10^5 celic/ml v preskusnem mediju brez estrogena. 100 µl resuspendiranih celic se nasadi v jamice na notranjem delu 96-jamične mikrotitrirske plošče. Jamice na robu se napolnijo z 200 µl fosfatnega pufra s soljo (PBS) (glej slike 1 in 2). Nasajene celice se 24 ur predinkubirajo v inkubatorju s CO₂ (5 % CO₂, 37 °C, 100-odstotna vlažnost).
37. Po predinkubaciji se plošče pregledajo za vidno citotoksičnost (glej Dodatek 4.1), kontaminacijo in konfluenco. Za preskušanje se uporabijo samo plošče, pri katerih se ne kaže vidna citotoksičnost in kontaminacija ter ki imajo vsaj 85-odstotno konfluenco. Medij se iz notranjih jamic previdno odstrani in nadomesti z 200 µl preskusnega medija brez estrogena, ki vsebuje ustrezne zaporedne razredčine referenčnih standardov, preskusnih kemikalij, pozitivnih kontrol, negativnih kontrol in kontrol s topilom (preglednica 5: študije z agonistom; preglednica 6: študije

z antagonistom). Vsi referenčni standardi, preskusne kemikalije, pozitivne kontrole, negativne kontrole in kontrole s topilom se preskusijo v treh ponovitvah. Na sliki 1 je prikazana razporeditev na plošči za preskušanje z agonistom. Na sliki 2 je prikazana razporeditev na plošči za preskušanje z antagonistom. Razporeditev na plošči za predhodno presejalno preskušanje in celovito preskušanje je enaka. Pri preskušanju z antagonistom vse notranje jamice, razen jamic za kontrolo z vehiklom (VC), vsebujejo tudi fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17β -estradiola (3×10^{-12} M). Upoštevati je treba, da je treba referenčna standarda C8 in C4 dodati na vsako ploščo s preskusno kemikalijo.

38. Po izpostavitvi celic vsem kemikalijam je treba 96-jamične mikrotitrne plošče še 24 ur inkubirati v inkubatorju s CO_2 (5 % CO_2 , 37 °C, 100-odstotna vlažnost).

Slika 1

Razporeditev na 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah za predhodno presejanje in oceno agonističnega učinka

Plošča 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Naslednje plošče

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = topilo z referenčnim standardom.

C(1–8) = serija razredčin (1–8, od nizke do visoke koncentracije) referenčnega standarda.

PC = pozitivna kontrola.

NC = negativna kontrola.

TCx-(1–8) = razredčine (1–8, od nizke do visoke koncentracije) preskusne kemikalije za predhodno presejalno ponovitev in oceno agonističnega učinka preskusne kemikalije x.

SC = kontrola preskusne kemikalije s topilom (optimalno enako topilo kot v C0, vendar po možnosti iz druge serije).

Sive celice: = zunanje jamice, napolnjene z 200 µl PBS.

Slika 2

Razporeditev na 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah za predhodno antagonistično presejanje in oceno antagonističnega učinka

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Naslednje plošče

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = topilo z referenčnim standardom.

C(1–8) = serija razredčin (1–8, od nizke do visoke koncentracije) referenčnega standarda.

NC = negativna kontrola.

PC = pozitivna kontrola.

TCx-(1–8) = razredčine (1–8, od nizke do visoke koncentracije) preskusne kemikalije za predhodno presejalno ponovitev in oceno agonističnega učinka preskusne kemikalije x.

SC = kontrola preskusne kemikalije s topilom (optimalno enako topilo kot v C0, vendar po možnosti iz druge serije).

VC = kontrola z vehiklom (kontrola s topilom brez fiksne koncentracije agonističnega referenčnega standarda 17 β -estradiola).

Sive celice: = zunanje jamice, napolnjene z 200 μ l PBS.

Opomba: vse notranje jamice, razen jamic za kontrolo z vehiklom (VC), vsebujejo tudi fiksno koncentracijo agonističnega referenčnega standarda 17 β -estradiola ($3,0 \times 10^{-12}$ M).

Merjenje luminiscence

39. Merjenje luminiscence je podrobno opisano v protokolih za preskuse z agonistom in antagonistom (10). Medij je treba odstraniti iz jamic in celice po 24 urah inkubiranja lizirati, da se odpre celična membrana in omogoči merjenje luciferazne aktivnosti.
40. Za merjenje luminiscence je pri tem postopku potreben luminometer, opremljen z dvema injektorjema. Luciferazna reakcija se začne z injiciranjem substrata luciferina, ustavi pa se tako, da se doda 0,2 M NaOH. Reakcija se ustavi, da se prepreči prenos luminiscence z ene jamice na drugo.
41. Svetloba, oddana iz vsake jamice, se izrazi kot relativna svetlobna enota (RLU) na jamico.

Predhodna izvedba presejanja

42. Na podlagi rezultatov predhodne presejalne analize se določi izpopolnjeno območje koncentracije preskusnih kemikalij za celovito preskušanje. Ocena rezultatov predhodne presejalne analize in določitev izpopolnjenega območja koncentracije preskusnih kemikalij za celovito preskušanje sta podrobno opisani v protokolih za preskus z agonistom in antagonistom (10). V nadaljevanju je kratek povzetek postopkov za določitev območja koncentracije preskusnih kemikalij za preskušanje z agonistom in antagonistom. Za navodila glede zasnove zaporednega redčenja glej preglednici 5 in 6.

Izbira koncentracij za oceno agonističnih učinkov

43. Med predhodno presejalno ponovitvijo je treba preskusne kemikalije preskusiti z uporabo serije razredčin, kot so navedene v preglednicah 5 (agonizem) in 6 (antagonizem). Vse koncentracije je treba preskusiti v treh jamicah v skladu z razporeditvijo na plošči, navedeno na sliki 1 (agonizem) ali 2 (antagonizem).
44. Samo rezultati analize, ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (preglednica 3), se štejejo za veljavne in jih je mogoče uporabiti za oceno odziva preskusnih kemikalij. Če ena ali več mikrotitrskih plošč v analizni seriji ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba zadevne mikrotitrskе plošče znova analizirati. Če prva plošča, ki vsebuje celotno serijo razredčin referenčnega standarda, ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba znova analizirati celotno preskusno serijo (6 plošč).
45. Začetna območja koncentracije preskusnih kemikalij je treba prilagoditi in predhodno presejalno ponovitev ponoviti, če:
 - je opažena citotoksičnost. Postopek predhodnega presejanja je treba ponoviti z nižjimi necitotoksičnimi koncentracijami preskusne kemikalije;
 - predhodno presejanje preskusne kemikalije ne pokaže celotne krivulje odziva na odmere, ker preskušene koncentracije povzročajo največjo indukcijo. Predhodno presejalno ponovitev je treba ponoviti z nižjimi koncentracijami preskusne kemikalije.
46. Če je opažen ustrezen z odmerkom povezan odziv, je treba izbrati (najnižjo) koncentracijo, pri kateri je opažena največja indukcija in ki ne kaže citotoksičnosti. Najvišja koncentracija preskusne kemikalije, ki jo je treba preskusiti v celovitih ponovitvah, mora biti trikratnik te izbrane koncentracije.
47. S koraki redčenja, navedenimi v preglednici 5, je treba pripraviti celotno izpopolnjeno serijo razredčin preskusne kemikalije, tako da se začne z najvišjo koncentracijo, kot je določena zgoraj.
48. Preskusno kemikalijo, ki ne povzroči nobenega agonističnega učinka, je treba preskusiti v celovitih ponovitvah, tako da se začne z najvišjo necitotoksično koncentracijo, opredeljeno med predhodnim presejalnim pregledom.

Izbira koncentracij za oceno antagonističnih učinkov

49. Za veljavne se štejejo samo rezultati analize, ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (preglednica 4), in jih je mogoče uporabiti za oceno odziva preskusnih kemikalij. Če ena ali več mikrotitrskih plošč v analizni seriji ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba zadevne mikrotitrške plošče znova analizirati. Če prva plošča, ki vsebuje celotno serijo razredčin referenčnega standarda, ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba znova analizirati celotno preskusno serijo (6 plošč).
50. Začetna območja koncentracije preskusnih kemikalij je treba prilagoditi in predhodno presejalno ponovitev ponoviti, če:
- je opažena citotoksičnost. Postopek predhodnega presejanja je treba ponoviti z nižjimi necitotoksičnimi koncentracijami preskusne kemikalije;
 - predhodno presejanje preskusne kemikalije ne pokaže celotne krivulje odziva na odmere, ker preskušene koncentracije povzročajo največjo inhibicijo. Predhodno presejanje je treba ponoviti z nižjimi koncentracijami preskusne kemikalije.
51. Če je ugotovljen ustrezen z odmerkom povezan odziv, je treba izbrati (najnižjo) koncentracijo, pri kateri je opažena največja inhibicija in ki ne kaže citotoksičnosti. Najvišja koncentracija preskusne kemikalije, ki jo je treba preskusiti v celovitih ponovitvah, mora biti trikratnik te izbrane koncentracije.
52. S koraki redčenja, navedenimi v preglednici 6, je treba pripraviti celotno izpopolnjeno serijo razredčin preskusne kemikalije, tako da se začne z najvišjo koncentracijo, kot je določena zgoraj.
53. Preskusne kemikalije, ki ne povzročijo nobenih antagonističnih učinkov, je treba preskusiti v celovitih ponovitvah, tako da se začne z najvišjo necitotoksično koncentracijo, preskušeno med predhodnim presejalnim pregledom.

Celovite ponovitve

54. Po izbiri izpopolnjenih območij koncentracije je treba preskusne kemikalije celovito preskusiti z uporabo serije razredčin, navedenih v preglednicah 5 (agonizem) in 6 (antagonizem). Vse koncentracije je treba preskusiti v treh jamicah v skladu z razporeditvijo na plošči, navedeno na sliki 1 (agonizem) ali 2 (antagonizem).
55. Samo rezultati analize, ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (preglednici 3 in 4), se štejejo za veljavne in jih je mogoče uporabiti za oceno odziva preskusnih kemikalij. Če ena ali več mikrotitrskih plošč v analizni seriji ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba zadevne mikrotitrške plošče znova analizirati. Če prva plošča, ki vsebuje celotno serijo razredčin referenčnega standarda, ne izpolnjuje meril za sprejemljivost, je treba znova analizirati celotno preskusno serijo (6 plošč).

Preglednica 5

Koncentracija in razredčine referenčnih standardov, kontrol in preskusnih kemikalij, uporabljenih za preskušanje z agonistom

Referenčni 17 β -estradiol		TCx – predhodna presejalna ponovitev		TCx – celovita ponovitev		Kontrole	
konc. (M)		razredčina		razredčina		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	3 * 10 ⁻⁶
C1	1 * 10 ⁻¹³	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1 * 10 ⁻⁸
C2	3 * 10 ⁻¹³	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1 * 10 ⁻¹²	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	3 * 10 ⁻¹²	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	6 * 10 ⁻¹²	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1 * 10 ⁻¹¹	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3 * 10 ⁻¹¹	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1 * 10 ⁻¹⁰						

TCx – preskusna kemikalija x.

PC – pozitivna kontrola (17 α -metilttestosteron).

NC – negativna kontrola (kortikosteron).

C0 – kontrola referenčnega standarda s topilom.

SC – kontrola preskusne kemikalije s topilom.

Preglednica 6

Koncentracija in razredčine referenčnih standardov, kontrol in preskusnih kemikalij, uporabljenih za preskušanje z antagonistom

Referenčni tamoksifen		TCx – predhodna presejalna ponovitev		TCx – celovita ponovitev		Kontrole	
konc. (M)		razredčina		razredčina		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1 * 10^{-9}$
C1	$3 * 10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1 * 10^{-5}$
C2	$1 * 10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3 * 10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1 * 10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3 * 10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	Dodani agonist	
C6	$1 * 10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	konc. (M)	
C7	$3 * 10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17 β -estradiol	$3 * 10^{-12}$
C8	$1 * 10^{-5}$						

TCx – preskusna kemikalija x.

PC – pozitivna kontrola (4-hidroksitamoksifen).

NC – negativna kontrola (resveratrol).

C0 – kontrola referenčnega standarda s topilom.

SC – kontrola preskusne kemikalije s topilom.

VC – kontrola z vehiklom (ne vsebuje fiksne koncentracije agonističnega referenčnega standarda 17 β -estradiola ($3,0 * 10^{-12}$ M)).

Zbiranje podatkov in podatkovna analiza

56. Po predhodnih presejalnih in celovitih ponovitvah je treba določiti EC_{10} , EC_{50} , PC_{10} , PC_{50} in največjo indukcijo (TCx_{max}) preskusne kemikalije za agonistično preskušanje. Za antagonistično preskušanje je treba izračunati IC_{20} , IC_{50} , PC_{80} , PC_{50} in najmanjšo indukcijo (TCx_{min}). Na slikah 3 (agonizem) in 4 (antagonizem) so ti parametri grafično prikazani. Potrebni parametri se izračunajo na podlagi relativne indukcije vsake preskusne kemikalije (glede na največjo indukcijo referenčnega standarda (= 100 %)). Za oceno podatkov je treba uporabiti nelinearno regresijo (variabilni naklon, 4 parametri) v skladu z naslednjo enačbo:

$$Y = dno + \frac{(vrh - dno)}{1 + 10(\lg EC_{50} - X)Hillov \text{ naklon}}$$

pri čemer je:

X = logaritem odmerka ali koncentracije

da = odziv (relativna indukcija (%))

Vrh = največja indukcija (%)

Dno = najmanjša indukcija (%)

$\lg EC_{50}$ = logaritem koncentracije, pri kateri je opaženih 50 % največjega odziva

Hillov naklon = naklonski faktor ali Hillov naklon

57. Neobdelane podatke iz luminometra, izražene kot relativne svetlobne enote (RLU), je treba prenesti v preglednico za podatkovno analizo, zasnovano za predhodne presejalne in celovite ponovitve. Neobdelani podatki morajo izpolnjevati merila za sprejemljivost, kot so navedena v preglednicah 3A in 3B (agonizem) ali 4A in 4B (antagonizem). Če neobdelani podatki izpolnjujejo merila za sprejemljivost, se za določitev potrebnih parametrov izvedejo v nadaljevanju navedeni računski koraki.

Agonizem

- Povprečno RLU kontrole referenčnega standarda s topilom odštejte od vsakega od neobdelanih podatkov analize referenčnih standardov.
- Povprečno RLU za kontrolo preskusne kemikalije s topilom odštejte od vsakega od neobdelanih podatkov analize preskusnih kemikalij.

- Izračunajte relativno indukcijo posamezne koncentracije referenčnega standarda. Indukcijo najvišje koncentracije referenčnega standarda nastavite na 100 %.
- Izračunajte relativno indukcijo posamezne koncentracije preskusne kemikalije v primerjavi z najvišjo koncentracijo referenčnega standarda kot 100 %.
- Ocenite rezultate analize na podlagi nelinearne regresije (variabilni naklon, 4 parametri).
- Določite EC_{50} in EC_{10} referenčnega standarda.
- Določite EC_{50} in EC_{10} preskusnih kemikalij.
- Določite največjo relativno indukcijo preskusne kemikalije (TC_{max}).
- Določite PC_{10} in PC_{50} preskusnih kemikalij.

Pri preskusnih kemikalijah ni vedno mogoče dobiti celotne krivulje odziva na odmere, npr. zaradi težav s citotoksičnostjo ali topnostjo. Zato EC_{50} , EC_{10} in PC_{50} ni mogoče določiti. V takem primeru se lahko določita samo PC_{10} in TC_{max} .

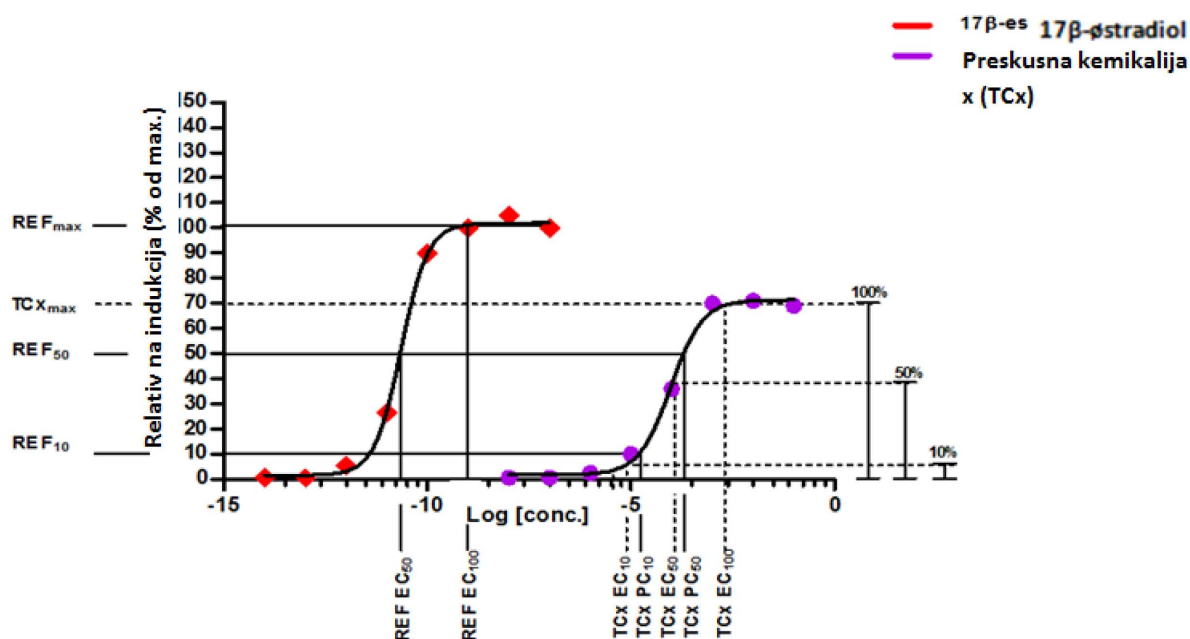
Antagonizem

- Povprečno RLU najvišje koncentracije referenčnega standarda odštejte od vsakega od neobdelanih podatkov analize referenčnih standardov.
- Povprečno RLU najvišje koncentracije referenčnega standarda odštejte od vsakega od neobdelanih podatkov analize preskusnih kemikalij.
- Izračunajte relativno indukcijo posamezne koncentracije referenčnega standarda. Indukcijo najnižje koncentracije referenčnega standarda nastavite na 100 %.
- Izračunajte relativno indukcijo posamezne koncentracije preskusne kemikalije v primerjavi z najnižjo koncentracijo referenčnega standarda kot 100 %.

- Ocenite rezultate analize na podlagi nelinearne regresije (variabilni naklon, 4 parametri).
- Določite IC_{50} in IC_{20} referenčnega standarda.
- Določite IC_{50} in IC_{20} preskusnih kemikalij.
- Določite najmanjšo relativno indukcijo preskusne kemikalije (TC_{min}).
- Določite PC_{80} in PC_{50} preskusnih kemikalij.

Slika 3

Pregled parametrov, določenih pri preskusu z agonistom



EC_{10} = koncentracija snovi, pri kateri je opaženih 10 % njenega največjega odziva.

EC_{50} = koncentracija snovi, pri kateri je opaženih 50 % njenega največjega odziva.

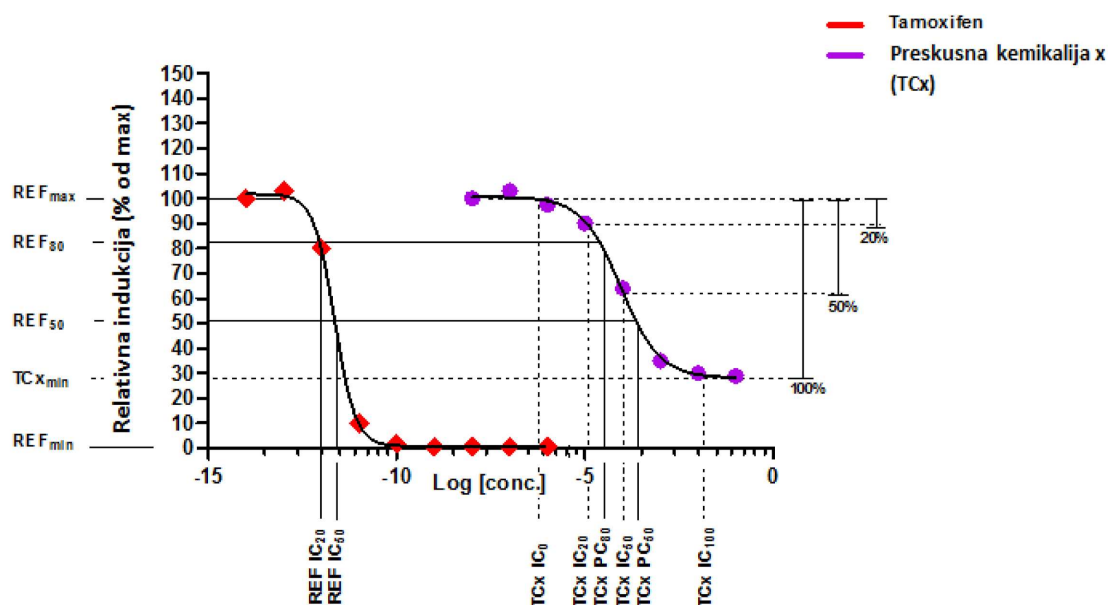
PC_{10} = koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je njen odziv enak EC_{10} referenčnega standarda.

PC_{50} = koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je njen odziv enak EC_{50} referenčnega standarda.

TCx_{max} = največja relativna indukcija preskusne kemikalije.

Slika 4

Pregled parametrov, določenih pri preskusu z antagonistom



IC₂₀ = koncentracija snovi, pri kateri je opaženih 80 % njenega največjega odziva (20-odstotna inhibicija).

IC₅₀ = koncentracija snovi, pri kateri je opaženih 50 % njenega največjega odziva (50-odstotna inhibicija).

PC₈₀ = koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je njen odziv enak IC₂₀ referenčnega standarda.

PC₅₀ = koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je njen odziv enak IC₅₀ referenčnega standarda.

TC_{xmin} = najmanjša relativna indukcija preskusne kemikalije.

Pri preskusnih kemikalijah ni vedno mogoče dobiti celotne krivulje odziva na odmere, npr. zaradi težav s citotoksičnostjo ali topnostjo. Zato IC₅₀, IC₂₀ in PC₅₀ ni mogoče določiti. V takem primeru se lahko določita samo PC₂₀ in TC_{min}.

58. Rezultati morajo temeljiti na dveh (ali treh) neodvisnih ponovitvah. Če se z dvema ponovitvama dobijo primerljivi in torej obnovljivi rezultati, tretje ponovitve ni treba izvesti. Rezultati so sprejemljivi, če:

— izpolnjujejo merila za sprejemljivost (glej Merila za sprejemljivost v odstavkih 14–22),

— so obnovljivi.

Merila za razlago rezultatov

59. Pri razlagi podatkov in odločanju, ali se preskusna kemikalija šteje za pozitivno ali negativno, je treba uporabiti v nadaljevanju navedena merila.

Agonizem

Pri vsaki celoviti ponovitvi se preskusna kemikalija šteje za **pozitivno**, če:

- 1 je TC_{max} najmanj enak 10 % največjega odziva referenčnega standarda (REF_{10});
- 2 sta vsaj dve zaporedni koncentraciji preskusne kemikalije najmanj enaki REF_{10} .

Pri vsaki celoviti ponovitvi se preskusna kemikalija šteje za **negativno**, če:

- 1 TC_{max} ne presega 10 % največjega odziva referenčnega standarda (REF_{10});
- 2 sta manj kot dve koncentraciji preskusne kemikalije najmanj enaki REF_{10} .

Antagonizem

Pri vsaki celoviti ponovitvi se preskusna kemikalija šteje za **pozitivno**, če:

- 1 je TC_{min} največ enak 80 % največjega odziva referenčnega standarda (REF_{80} = 20-odstotna inhibicija);
- 2 sta vsaj dve zaporedni koncentraciji preskusne kemikalije največ enaki REF_{80} .

Pri vsaki celoviti ponovitvi se preskusna kemikalija šteje za **negativno**, če:

- 1 TC_{min} presega 80 % največjega odziva referenčnega standarda (REF_{80} = 20-odstotna inhibicija);
- 2 sta manj kot 2 koncentraciji preskusne kemikalije največ enaki REF_{80} .

60. Da se opredeli jakost pozitivnega odziva preskusne kemikalije, je treba navesti velikost učinka (agonizem: TC_{max} ; antagonizem: TC_{min}) in koncentracijo, pri kateri se učinek pojavi (agonizem: EC_{10} , EC_{50} , PC_{10} , PC_{50} ; antagonizem: IC_{20} , IC_{50} , PC_{80} , PC_{50}).

POROČILO O PRESKUSU

61. Glej odstavke 20 'ELEMENTI PRESKUSA TA ER'.

VIRI

- (1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ER α CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 240). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (2) Sonneveld, E., Jansen, H. J., Riteco, J. A., Brouwer, A., in van der Burg, B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136–148.
- (3) Quaedackers, M. E., van den Brink, C. E., Wissink, S., Schreurs, R. H. M. M., Gustafsson, J. A., van der Saag, P. T., in van der Burg, B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) α and not through ER β . *Endocrinology* 142(3), 1156–1166.
- (4) Thorne, N., Inglese, J., in Auld, D. S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology* 17(6): 646–57.
- (5) Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J. P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J. C., Cavaillès, V., in Balaguer, P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459–1469.
- (6) Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B., in Gustafsson, J. A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252–4263.
- (7) Sotoca, A. M., Bovee, T. F. H., Brand, W., Velikova, N., Boeren, S., Murk, A. J., Vervoort, J., Rietjens, I. M. C. M. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 122, 204–211.

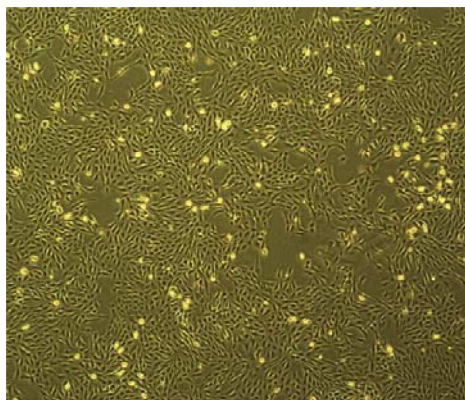
-
- (8) Sonneveld, E., Riteco, J. A. C., Jansen, H. J., Pieterse, B., Brouwer, A., Schoonen, W. G., in van der Burg, B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89(1), 173–187.
- (9) Kobayashi, H., Yamamoto, K., Eguchi, M., Kubo, M., Nakagami, S., Wakisaka, S., Kaizuka, M., in Ishii, H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769–771.
- (10) Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y, in Oldenburg, K. R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Scr.*, 4, 67–73.
- (11) Besselink, H., Middelhof, I., in Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Nizozemska.

Dodatek 4.1:

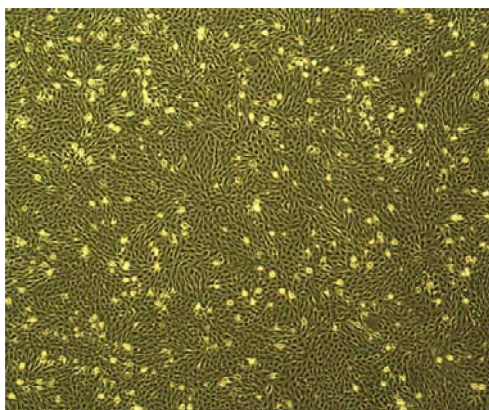
VIZUALNI PREGLED VIABILNOSTI CELIC



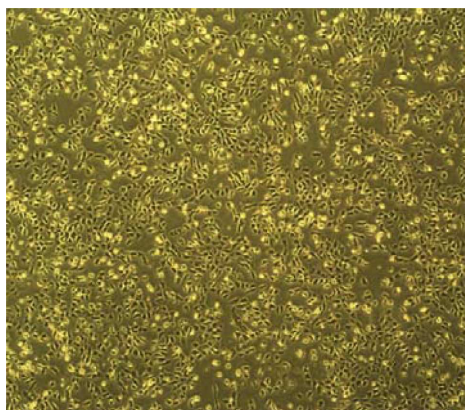
< 5-odstotna konfluenca. Celice so bile pravkar nasajene. 100-odstotna viabilnost celic. Razvrstitev: „ni citotoksičnosti“.



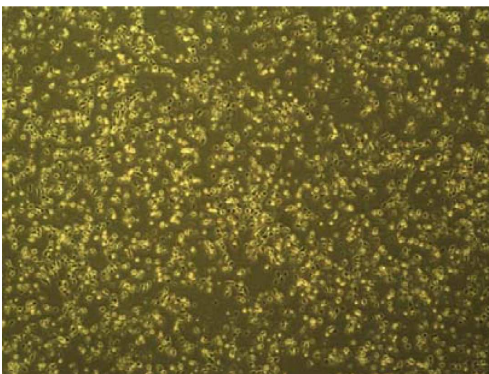
> 85-odstotna konfluenca. V tej fazi se celice izpostavijo preskusnim kemikalijam. > 95-odstotna viabilnost celic. Razvrstitev: „ni citotoksičnosti“.



> 95-odstotna konfluenca. Celice so gosto natlačene in se začenjajo preveč razraščati. > 95-odstotna viabilnost celic. Razvrstitev: „ni citotoksičnosti“.



< 25-odstotna viabilnost celic. Celice se ločijo in stik med celicami se zmanjša. Celice so zaokrožene. Razvrstitev: „citotoksičnost“.



< 5-odstotna viabilnost celic. Celice so popolnoma ločene, stik med njimi je pretrgan. Celice so zaokrožene. Razvrstitev: „citotoksičnost“.

B.67 IN VITRO PRESKUSI GENSKIH MUTACIJ V CELICAH SESALCEV Z UPORABO GENA ZA TIMIDIN KINAZO**UVOD**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 490 (2016). Preskusne metode se redno pregledujejo in revidirajo ob upoštevanju znanstvenega napredka, regulativnih zahtev in dobrobiti živali. Preskus z limfomom miši (MLA) in preskus TK6 z uporabo lokusa za timidin kinazo (TK) je prvotno vsebovala preskusna metoda B.17. Pozneje je strokovna skupina za MLA mednarodne delavnice o preskušanju genotoksičnosti (IWGT) razvila mednarodno usklajena priporočila v zvezi z merili za sprejemljivost preskusa in razlago podatkov v zvezi z MLA (1) (2) (3) (4) (5), ki so vključena v to novo preskusno metodo B.67. Ta preskusna metoda je napisana za preskus MLA, in ker se pri njej uporablja tudi lokus za TK, preskus TK6. Medtem ko je bila uporaba preskusa MLA za regulativne namene zelo razširjena, se je preskus TK6 uporabljal precej redkeje. Opozoriti je treba, da kljub podobnosti med končnimi točkami ti celični liniji nista medsebojno zamenljivi, v regulativnih programih pa se lahko za določeno regulativno uporabo upravičeno daje prednost eni pred drugo. Validacija preskusa MLA je na primer pokazala njegovo ustreznost za zaznavanje ne le genske mutacije, ampak tudi sposobnosti preskusne kemikalije, da povzroči strukturne kromosomske poškodbe. Ta preskusna metoda je del sklopa preskusnih metod v zvezi z genetsko toksikologijo. OECD je pripravila dokument z jedrnatimi informacijami o preskušanju v zvezi z genetsko toksikologijo in pregledom nedavnih sprememb smernic OECD za preskušanje v zvezi z genetsko toksikologijo (6).
2. Namen preskusov genskih mutacij v celicah sesalcev *in vitro* je zaznati genske mutacije, katerih nastanek povzročijo kemikalije. S celičnimi linijami, ki se uporabljajo pri teh preskusih, se merijo napredne mutacije na poročevalskih genih, natančneje endogenem genu za timidin kinazo (TK za človeške celice in Tk za celice glodavcev, pri tej preskusni metodi skupaj navedene kot TK). Pri tej preskusni metodi naj bi se uporabljali dve celični liniji: celična linija limfoma miši L5178Y TK^{+/+}-3.7.2C (na splošno imenovana L5178Y) in človeška limfoblastoidna celična linija TK6 (na splošno imenovana TK6). Čeprav se celični liniji razlikujeta po izvoru, celični rasti, statusu proteina p53 itd., se lahko preskusi genskih mutacij na TK pri obeh vrstah celic izvedejo podobno, kot je opisano v tej preskusni metodi.
3. Avtosomalne in heterozigotne lastnosti gena za timidin kinazo omogočajo zaznavo viabilnih kolonij, katerih celicam po mutaciji iz TK^{+/+} v TK^{-/-} primanjkuje encima timidin kinaze. Ta primanjkljaj je lahko posledica genskih pojavov, ki vplivajo na gen TK, vključno z obema genskima mutacijama (točkovne mutacije, mutacije premika bralnega okvira, majhne delecije itd.), in kromosomskih pojavov (velike delecije, kromosomske prerazporeditve in mitotična rekombinacija). Zадnjenavedeni pojavi se izrazijo kot izguba heterozigotnosti, ki je pogosta genska sprememba tumor zavirajočih genov v tumorogenosti pri človeku. Teoretično je izgubo celotnega kromosoma, ki nosi gen TK, zaradi okvare delitvenega vretena in/ali mitotičnega nerazdvajanja mogoče zaznati pri preskusu MLA. Dejansko kombinacija citogenetske in molekularne analize jasno pokaže, da so nekatere mutante MLA TK posledica nerazdvajanja. Vendar zanesljivost dokazov kaže, da s preskusi mutacij gena TK ni mogoče zanesljivo zaznati anevgenov, če se uporabljajo standardna merila za citotoksičnost (kot so opisana v tej preskusni metodi), zato ni ustrezno, da se ti preskusi uporabljajo za zaznavanje anevgenov (7) (8) (9).
4. Pri preskusih mutacij gena TK nastaneta dva različna fenotipska razreda mutant TK: normalno rastoče mutante, ki rastejo enako hitro kot heterozigotne celice TK, in počasi rastoče mutante, ki rastejo z daljšimi podvojitvenimi časi. Normalno rastoče in počasi rastoče mutante se pri preskusu MLA prepoznajo kot mutante z velikimi kolonijami in mutante z majhnimi kolonijami, pri preskusu TK6 pa kot mutante z zgodaj nastalimi kolonijami in mutante s pozno nastalimi kolonijami. Molekularne in citogenetske lastnosti mutant z velikimi in majhnimi kolonijami so bile podrobno raziskane (8) (10) (11) (12) (13). Prav tako so bile obširno raziskane molekularne in citogenetske lastnosti zgodaj nastalih in pozno nastalih mutant TK6 (14) (15) (16) (17). Počasi rastoče mutante so pri obeh vrstah celic utrpeli genske poškodbe, ki vključujejo domnevne gene za uravnavanje rasti v bližini lokusa TK, kar povzroči daljše podvojitvene čase in tvorbo pozno nastalih ali majhnih kolonij (18). Nastanek počasi rastočih mutant se povezuje s kemikalijami, ki povzročajo obsežne strukturne spremembe na ravni kromosomov. Celice, katerih poškodbe ne vključujejo domnevnih genov za uravnavanje rasti v bližini lokusa TK, rastejo podobno hitro kot starševske celice in postanejo normalno rastoče mutante. Nastanek primarno normalno rastočih mutant se povezuje s kemikalijami, ki primarno delujejo kot točkovni mutageni. Zato je nujno, da se preštejejo tako počasi rastoče kot tudi normalno rastoče mutante, da se dobijo vse mutante in se zagotovi določen vpogled v vrste poškodb (mutagene proti klastogenim), ki jih povzroča preskusna kemikalija (10) (12) (18) (19).

5. Preskusna metoda iz smernice za preskušanje je urejena tako, da zagotavlja splošne informacije, ki veljajo za MLA in TK6, ter posebna navodila za posamezne preskuse.
6. Uporabljene opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

7. Pri preskusih, izvedenih *in vitro*, je običajno treba uporabiti zunanji vir presnovne aktivacije. Zunanji sistem presnovne aktivacije ne posnema pogojev *in vivo* v celoti.
8. Paziti je treba, da se preprečijo pogoji, ki bi lahko vodili do lažno pozitivnih rezultatov (tj. morebitnemu medsebojnemu delovanju s preskusnim sistemom), ki jih ne bi povzročilo medsebojno delovanje preskusne kemikalije in genetskega materiala celice; med take pogoje spadajo spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti, medsebojno delovanje sestavin gojišča (20) (21) ali previsoke ravni citotoksičnosti (22) (23) (24). Za citotoksičnost, ki presega priporočene najvišje ravni citotoksičnosti, kot so opredeljene v odstavku 28, se šteje, da je prevelika za preskusa MLA in TK6. Poleg tega je treba opozoriti, da se lahko zaradi preskusnih kemikalij, ki so analogi timidina ali se obnašajo kot analogi timidina, poveča pogostnost mutant s selektivno rastjo spontanih mutant v ozadju med tretiranjem celic in zahtevajo dodatne preskusne metode za ustrezno oceno (25).
9. Pri proizvedenih nanomaterialih so morda potrebne posebne prilagoditve te preskusne metode, ki pa pri tej metodi niso opisane.
10. Preden se preskusna metoda uporabi za preskušanje zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.
11. Mutirane celice brez delovanja encima timidin kinaza (TK) zaradi mutacije $TK^{+/-}$ do $TK^{-/-}$ so odporne proti citostatičnim učinkom pirimidinskega analoga trifluorotimidina (TFT). Celice s TK so občutljive za TFT, ki zavira celično presnovo in ustavi celično delitev. Mutirane celice so tako sposobne množitve v navzočnosti TFT in tvorijo vidne kolonije, celice, ki vsebujejo encim timidin kinaza, pa ne.

NAČELO PRESKUSA

12. Celice v suspenziji se za ustrezno časovno obdobje (glej odstavek 33) izpostavijo preskusni kemikaliji z zunanjim virom presnovne aktivacije in brez njega (glej odstavek 19), nato pa se kultivirajo na novem gojišču, da se določi citotoksičnost in omogoči izražanje fenotipa pred selekcijo mutant. Citotoksičnost je določena z relativno skupno rastjo (RTG – glej odstavek 25) pri preskusu MLA in relativnim preživetjem (RS – glej odstavek 26) pri preskusu TK6. Tretirane kulture se vzdržujejo v gojišču dovolj dolgo obdobje, značilno za vsako vrsto celic (glej odstavek 37), ki omogoči skoraj optimalno izražanje fenotipa induciranih mutacij. Po izražanju fenotipa se pogostnost mutant določi z nasaditvijo znanega števila celic v gojišče s selektivno snovjo, da se zaznajo mutirane kolonije, in v gojišče brez selektivne snovi, da se določi učinkovitost tvorbe klonov (viabilnost). Po ustrezno dolgi inkubaciji se preštejejo kolonije. Pogostnost mutant se izračuna iz števila mutiranih kolonij, korigiranega z učinkovitostjo tvorbe klonov ob selekciji mutant.

OPIS METODE

Pripravki

Celice

13. Za preskus MLA: ker je bil preskus MLA razvit in opredeljen z uporabo podlinije $TK^{+/-}$ -3.7.2C celic L5178Y, je treba pri preskusu MLA uporabiti to specifično podlinijo. Celična linija L5178Y je bila pridobljena iz z metilkolantrenom povzročenega timičnega limfoma pri miši DBA-2 (26). Clive in sodelavci so celice L5178Y (ki jih je Clive označil kot $TK^{+/-}$ -3) tretirali z etil-metan-sulfonatom in izolirali klon $TK^{-/-}$ (označen kot $TK^{-/-}$ -3.7), pri čemer so kot selektivno snov uporabili bromdeoksiuridin. Iz klona $TK^{-/-}$ sta bila izolirana spontani klon $TK^{+/-}$ (označen kot $TK^{+/-}$ -3.7.2.) in podklon (označen kot $TK^{+/-}$ -3.7.2C) ter sta bila opredeljena za uporabo pri preskusu MLA (27). Kariotip celične linije je bil objavljen (28) (29) (30) (31). Modalno kromosomsko število je 40. Obstaja metacentrični

kromosom (t12;13), ki ga je treba šteti kot en kromosom. Lokus TK pri miši je na distalnem koncu kromosoma 11. Celična linija L5178Y TK⁺ -3.7.2C ima mutacije na obeh alelih p53 in proizvaja mutiran protein p53 (32) (33). Status proteina p53 v celični liniji TK⁺-3.7.2C je verjetno odgovoren za to, da je mogoče s preskusom zaznati obsežne poškodbe (17).

14. Za preskus TK6: TK6 je človeška limfoblastoidna celična linija. Starševska celična linija je z Epstein-Barrovim virusom transformirana celična linija, WI-L2, ki je bila prvotno pridobljena od petletnika z dedno sferocitozo. Prvi izolirani klon HH4 je bil mutiran z ICR191 in nastala je heterozigotna celična linija TK – TK6 (34). Celice TK6 so skoraj diploidi, reprezentativni kariotip pa je 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Lokus človeškega TK je na dolgem kraku kromosoma 17. TK6 je s p53 kompetentna celična linija, ker ima sekvenco divjega tipa p53 na obeh alelih in izraža samo divji tip proteina p53 (36).
15. Tako pri preskusu MLA kot tudi pri preskusu TK6 je priporočljivo, da preskuševalni laboratorij ob prvi vzpostavitvi ali dopolnitvi osnovne zaloge zagotovi, da ni okužbe z *mikoplazmo*, določi kariotip celic ali pobarva kromosome z lokusom TK ter preveri podvojitvene čase populacije. Določiti je treba običajno trajanje celičnega cikla celic, uporabljenih v preskuševalnem laboratoriju, ki mora biti skladno z objavljenimi lastnostmi celic (16) (19) (37). To osnovno zalogo je treba hraniti pri -150 °C ali manj in uporabiti za pripravo vseh delovnih zalog celic.
16. Pred vzpostavitvijo velikega števila delovnih zalog, shranjenih z zamrzovanjem, ali tik pred uporabo v poskusu je iz kultur morda treba odstraniti že obstoječe mutirane celice (razen če je pogostnost mutant v kontroli s topilom že znotraj sprejemljivega razpona – glej preglednico 2 za preskus MLA). Za to sta potrebna uporaba metotreksata (aminopterina), da se ne izberejo celice brez TK ter dodajanje timidina, hipoksantina in glicina (L5178Y) ali 2'-deoksicitidina (TK6) v kulturo, da se zagotovi optimalna rast s TK kompetentnih celic (19) (38) (39), in (40) za TK6). Splošna navodila za dobro prakso pri vzdrževanju celičnih kultur ter posebna navodila za celice L5178Y in TK6 so na voljo v virih (19) (31) (37) (39) (41). Za laboratorije, ki potrebujejo zaloge izvornih celic za iniciacijo MLA ali TK6 ali pridobitev novih zalog izvornih celic, je na voljo celična shramba z dobro opredeljenimi celicami (37).

Gojišča in pogoji kultiviranja

17. Pri obeh preskusih je treba za vzdrževanje kultur uporabiti ustrezno gojišče in pogoje inkubacije (npr. posode za gojenje, vlažno ozračje s 5 % CO₂, temperatura inkubacije 37 °C). Celične kulture je treba vedno vzdrževati v pogojih, ki zagotavljajo njihovo rast v logaritemski fazi. Posebno pomembno je, da se izberejo takšna gojišča in pogoji kultiviranja, ki zagotavljajo optimalno rast celic v obdobju izražanja in tvorbo klonov mutiranih in nemutiranih celic. Pri preskusih MLA in TK6 je tudi pomembno, da pogoji kultiviranja zagotavljajo optimalno rast mutant TK z velikimi kolonijami/ki se pojavijo zgodaj in z majhnimi kolonijami/ki se pojavijo pozno. Več podrobnosti o kultiviranju, vključno s potrebo po ustreznem segrevanju neaktivnega konjskega seruma, če se pri selekciji mutant uporablja medij RPMI, je na voljo v virih (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Priprava kultur

18. Celice se namnožijo iz osnovnih kultur in nasadijo v gojišče tako na gosto, da suspenzijske kulture med obdobji tretiranja in izražanja še naprej eksponentno rastejo.

Presnovna aktivacija

19. Pri uporabi celic L5178Y in TK6 je treba uporabiti zunanje presnovne sisteme, ker imajo neustrezno notranjo sposobnostjo presnavljanja. Najpogosteje uporabljeni sistem, ki je priporočen kot privzet, razen če ni drugače utemeljeno, je s kofaktorjem dopolnjena postmitohondrijska frakcija (S9), pripravljena iz jeter glodavcev (običajno podgan), ki so bila tretirana s sredstvi za encimsko indukcijo, kot je Aroclor 1254 (43) (44) (45), ali mešanico fenobarbitala in β-naftoflavona (46) (47) (48) (49) (50) (51). Ta mešanica ni v nasprotju s Stockholmsko konvencijo o obstojnih organskih onesnaževalih (52) ter se je v primerjavi s sredstvom Aroclor 1254 izkazala kot enako

učinkovita za povzročanje oksidaz z mešano funkcijo (45) (46) (47) (48) (49). Frakcija S9 se na končnem preskusnem gojišču običajno uporablja v koncentracijah, ki se gibljejo v razponu od 1 do 2 vol. %, lahko pa se poveča na 10 vol. %. Na izbiro vrste in koncentracije zunanega sistema presnovne aktivacije ali sredstva za indukcijo presnove lahko vpliva razred preskusnih kemikalij.

Priprava preskusne kemikalije

20. Trdne preskusne kemikalije je treba pred tretiranjem celic pripraviti v ustreznih topilih, in če je ustrezno, razredčiti (glej odstavek 21). Tekoče preskusne kemikalije se lahko dodajo neposredno v preskusni sistem in/ali razredčijo pred tretiranjem preskusnega sistema. Plinaste ali hlapne preskusne kemikalije je treba preskusiti z ustrezno prilagojenimi standardnimi protokoli, kot je tretiranje v zatesnjenih posodah za gojenje (53) (54) (55). Preskusne kemikalije je treba pripraviti tik pred tretiranjem, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

PRESKUSNI POGOJI

Topila

21. Izbrati je treba tako topilo, ki optimizira topnost preskusne kemikalije in ne vpliva negativno na izvedbo preskusa, npr. ne spremeni rasti celic, ne vpliva na celovitost preskusne kemikalije, ne reagira s posodami za gojenje, ne ovira sistema presnovne aktivacije. Priporočljivo je, da se, kadar koli je to mogoče, najprej razmisli o uporabi vodnega topila (ali gojišča). Zelo uveljavljeni topili sta na primer voda ali dimetil sulfoksid. Organska topila na končnem obdelovalnem gojišču v splošnem ne smejo presegati 1 vol. %, vodna topila (fiziološka raztopina ali voda) pa ne 10 vol. %. Če se uporabljajo neuveljavljena topila (npr. etanol ali aceton), je treba njihovo uporabo podpreti s podatki, ki dokazujejo njihovo združljivost s preskusnimi kemikalijami in preskusnim sistemom ter odsotnost genotoksičnosti pri uporabljeni koncentraciji. Če takšnih podpornih podatkov ni, je treba dodati netretirane kontrole (glej Dodatek 1, Opredelitve pojmov), ki dokazujejo, da izbrano topilo ne povzroča škodljivih ali mutagenih učinkov.

MERJENJE CITOTOKSIČNOSTI IN IZBIRA KONCENTRACIJ ZA TRETIRANJE

22. Pri določanju najvišje koncentracije preskusne kemikalije se je treba izogibati koncentracijam, pri katerih se lahko pojavijo lažno pozitivni odzivi, kot so tisti, ki povzročajo preveliko citotoksičnost (glej odstavek 28), obarjanje (glej odstavek 29) v gojišču ali znatne spremembe vrednosti pH ali osmolarnosti (glej odstavek 8). Če preskusna kemikalija ob dodajanju povzroči znatno spremembo vrednosti pH v gojišču, se lahko vrednost pH prilagodi z dodajanjem pufra v končno obdelovalno gojišče, da se preprečijo lažno pozitivni rezultati in vzdržujejo ustrezni pogoji kultiviranja.
23. Izбира koncentracije temelji na citotoksičnosti in drugih preudarkih (glej odstavke 27–30). Čeprav je lahko koristno, da se zaradi boljšega določanja koncentracij, ki jih je treba uporabiti v glavnem preskusu, citotoksičnost oceni v začetnem preskusu, ta preskus ni obvezen. Tudi če se izvede začetna ocena citotoksičnosti, je treba pri glavnem preskusu še vedno izmeriti citotoksičnost vsake kulture. Če se izvede poskus za določanje območja, mora zajemati širok razpon koncentracij in se lahko konča prvi dan po tretiranju ali pa se nadaljuje drugi dan izražanja in do selekcije mutant (če se zdi, da so uporabljene koncentracije ustrezne).
24. Citotoksičnost je treba določiti za vsako posamezno preskusno kulturo in kontrolno kulturo: metode za preskus MLA (2) in preskus TK6 (15) so opredeljene z mednarodno dogovorjeno prakso.
25. Za različici preskusa MLA z agarjem in mikrotitrsko ploščo: Citotoksičnost je treba oceniti z uporabo relativne skupne rasti (RTG), ki sta jo prvotno opredelila Clive in Spector leta 1975 (2). Ta meritev vključuje relativno rast v suspenziji (RSG: preskusna kultura glede na kontrolo s topilom) med tretiranjem celic, čas izražanja in relativno učinkovitost tvorbe klonov (RCE: preskusna kultura glede na kontrolo s topilom) ob selekciji mutant (2). Opozoriti je treba, da relativna rast v suspenziji vključuje morebitno izgubo celic v preskusni kulturi med tretiranjem (za formule glej Dodatek 2).

26. Za preskus TK6: Citotoksičnost je treba oceniti na podlagi relativnega preživetja, tj. učinkovitosti tvorbe klonov celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, prilagojeni za morebitno izgubo celic med tretiranjem na podlagi štetja celic v primerjavi z negativno kontrolo (ki se ji pripiše 100-odstotno preživetje) (za formulo glej Dodatek 2).
27. Oceniti je treba vsaj štiri preskusne koncentracije (v kar niso vključeni topilo in pozitivne kontrole), ki izpolnjujejo merila za sprejemljivost (ustrezna citotoksičnost, število celic itd.). Čeprav je priporočljiva uporaba podvojenih kultur, se lahko pri vsaki preskušeni koncentraciji uporabi ponovljeni vzorec kulture ali le ena sama tretirana kultura. Rezultate, pridobljene za ponovljene vzorce kultur pri zadevni koncentraciji, je treba navesti ločeno, vendar se lahko za podatkovno analizo združijo (55). Za preskusne kemikalije, ki kažejo malo ali nič citotoksičnosti, so ustrezni približno 2- do 3-kratni intervali med koncentracijami. V primeru citotoksičnosti je treba koncentracije izbrati tako, da zajemajo območje citotoksičnosti od koncentracije, ki povzroča citotoksičnost, kot je opisano v odstavku 28, do vključno koncentracij, pri katerih je citotoksičnost zmerna oziroma majhna ali je ni. Pri številnih preskusnih kemikalijah so vidne strme krivulje odziva na koncentracijo, zato je treba za zajem celotnega območja citotoksičnosti ali podrobno preučevanje odziva na koncentracijo morda uporabiti večje število koncentracij, ki so tesno skupaj, in več kot štiri koncentracije, zlasti kadar je treba poskus ponoviti (glej odstavke 70). Uporaba več kot štirih koncentracij je lahko še zlasti pomembna, če se uporabi ena sama kultura.
28. Če največja koncentracija temelji na citotoksičnosti, si je treba pri najvišji koncentraciji pri preskusu MLA prizadevati za od 20- do 10- odstotno relativno skupno rast, pri preskusu TK6 pa za od 20-do 10-odstotno relativno preživetje (odstavek 67).
29. Pri slabo topnih preskusnih kemikalijah, ki pri koncentracijah, nižjih od najnižje netopne koncentracije, niso citotoksične, mora najvišja analizirana koncentracija ob koncu tretiranja s preskusno kemikalijo povzročiti nastanek motnosti ali oborine, ki je vidna s prostim očesom ali pod invertnim mikroskopom. Tudi če se citotoksičnost pojavi nad najnižjo netopno koncentracijo, je priporočljivo, da se preskusi le pri eni koncentraciji, ki povzroči nastanek motnosti ali vidne oborine, saj lahko oborina povzroči lažne učinke. Ker se pri preskusih MLA in TK6 uporabljajo suspenzijske kulture, je treba še zlasti paziti, da oborina ne vpliva na izvedbo preskusa. Koristno je lahko tudi, če se pred preskusom določi topnost v gojišču.
30. Če oborina ni vidna ali ni opažene mejne citotoksičnosti, mora najvišja preskusna koncentracija ustrezati 10 mM, 2 mg/ml ali 2 µl/ml, pri čemer se upošteva najnižja od teh koncentracij (57) (58). Če preskusna kemikalija nima določene sestave, kot so snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali (tj. kemijske snovi z neznano ali spremenljivo sestavo (UVCB)), okoljski ekstrakti itd., je v primeru odsotnosti ustrezne citotoksičnosti morda treba povečati najvišjo koncentracijo (npr. 5 mg/ml), da bi se povečala koncentracija vsake posamezne sestavine. Vendar je treba opozoriti, da se lahko pri zdravlilih za uporabo v humani medicini te zahteve razlikujejo (59).

Kontrole

31. Za vsak preskusni pogoj je treba vključiti sočasne negativne kontrole (glej odstavke 21), sestavljene le iz topila v obdelovalnem gojišču, ki je obdelano enako kot kulture za tretiranje.
32. Sočasne pozitivne kontrole so potrebne, da se dokažejo zmožnost laboratorija, da odkrije mutagene pod pogoji uporabljenega preskusnega protokola, učinkovitost zunanega sistema presnovne aktivacije (če je ustrezno) in ustrezna zaznava majhnih/pozno nastalih in velikih/zgodaj nastalih mutant TK. Primeri pozitivnih kontrol so navedeni v preglednici 1. Za pozitivno kontrolo se lahko uporabijo tudi druge snovi, če je to utemeljeno. Ker so preskusi genske toksičnosti *in vitro* za celice sesalcev dovolj standardizirani za kratkotrajna tretiranja (3–4 ure), ki se izvedejo sočasno s presnovno aktivacijo in brez nje ter z enakim trajanjem tretiranja, je uporaba pozitivnih kontrol lahko omejena na mutagen, pri katerem je potrebna presnovna aktivacija. V tem primeru en sam odziv pri pozitivni kontroli dokaže tako dejavnost sistema presnovne aktivacije kot tudi odzivnost preskusnega sistema. Vendar je treba pri dolgotrajnem tretiranju (tj. 24 ur brez S9), če se uporablja, uporabiti lastno pozitivno kontrolo, saj se trajanje tretiranja razlikuje od preskusa, pri katerem se uporablja presnovna aktivacija. Vsako pozitivno kontrolo je treba uporabiti pri eni ali več koncentracijah, pri katerih se pričakuje obnovljivo in zaznavno povečanje glede na ozadje, da se dokaže občutljivost preskusnega sistema, odziva pa ne sme ogroziti citotoksičnost, ki bi preseгла meje, določene za to preskusno metodo (glej odstavke 28).

Preglednica 1

Referenčne snovi, ki se priporočajo za ocenjevanje usposobljenosti laboratorija in izbor pozitivne kontrole

Kategorija	Snov	Št. CAS
1. Mutageni, aktivni brez presnovne aktivacije		
Metil metansulfonat		66-27-3
Mitomycin C		50-07-7
4-nitrokvinolin-N-oksidi		56-57-5
2. Mutageni, pri katerih je potrebna presnovna aktivacija		
Benzo(a)piren		50-32-8
Ciklofosamid (monohidrat)		50-18-0 (6055-19-2)
7,12-dimetilbenzoantracen		57-97-6
3-metilholantren		56-49-5

POSTOPEK

Tretiranje s preskusno kemikalijo

33. Množiče se celice se tretirajo s preskusno kemikalijo v prisotnosti in odsotnosti sistema presnovne aktivacije. Čas izpostavljenosti mora biti ustrezno dolg (navadno je ustrezno 3–4 ure). Vendar je treba opozoriti, da se lahko pri zdravljenju za uporabo v humani medicini te zahteve razlikujejo (59). Pri preskusu MLA se v primerih, ko kratkotrajno tretiranje da negativne rezultate in informacije kažejo, da je potrebno daljše tretiranje (npr. nukleozidni analogi, slabo topne kemikalije (5) (59)), je treba razmisliti o izvedbi preskusa z daljšim tretiranjem, tj. 24 ur brez S9.
34. Najmanjše število celic, ki se za vsako preskusno kulturo (kontrolno in tretirano) uporabijo v vsaki fazi preskusa, mora temeljiti na pogostnosti spontanega mutant. Splošno vodilo je, da se tretira in pasajira dovolj celic v vsaki preskusni kulturi, da se v vseh fazah preskusa (tretiranje, izražanje fenotipa in selekcija mutant) vzdržuje vsaj 10, v idealnem primeru pa 100 spontanega mutant (56).
35. Pri preskusu MLA je priporočena sprejemljiva pogostnost spontanega mutant med $35\text{--}140 \times 10^{-6}$ (različica z agarjem) in $50\text{--}170 \times 10^{-6}$ (različica z mikrotitrsko ploščo) (glej preglednico 2). Da se za vsako preskusno kulturo dobi vsaj 10 in v idealnem primeru 100 spontanega mutant, ki preživijo tretiranje, je treba tretirati vsaj 6×10^6 celic. S tretiranjem takega števila celic in vzdrževanjem dovolj celic med izražanjem in kloniranjem za selekcijo mutant se zagotovi zadostno število spontanega mutant (10 ali več) med vsemi fazami poskusa, tudi za kulture, tretirane pri koncentracijah, ki povzročijo 90-odstotno citotoksičnost (kot je izmerjena z 10-odstotno relativno skupno rastjo) (19) (38) (39).
36. Pri preskusu TK6 pogostnost spontanega mutant na splošno znaša med 2 in 10×10^{-6} . Da se za vsako kulturo dobi vsaj 10 spontanega mutant, ki preživijo tretiranje, je treba tretirati vsaj 20×10^6 celic. S tretiranjem takega števila celic se zagotovi zadostno število spontanega mutant (10 ali več), in to tudi za kulture, tretirane pri koncentracijah, ki povzročijo 90-odstotno citotoksičnost med tretiranjem (10-odstotno relativno preživetje). Poleg tega je treba v obdobju izražanja kultivirati zadostno število celic in jih nasaditi na ploščo za selekcijo mutant (60).

Čas izražanja fenotipa ter merjenje citotoksičnosti in pogostnosti mutant

37. Ob koncu obdobja tretiranja se celice določen čas kultivirajo, da se omogoči skoraj optimalno izražanje fenotipa na novo induciranih mutant; specifičnih za vsako celično linijo. Pri preskusu MLA obdobje izražanja fenotipa traja 2 dni. Pri preskusu TK6 obdobje izražanja fenotipa traja 3–4 dni. Če se uporabi 24-urno tretiranje, se obdobje izražanja začne po koncu tretiranja.
38. V obdobju izražanja fenotipa se celice preštejejo vsak dan. Pri preskusu MLA se na podlagi dnevnega štetja celic izračuna dnevna rast v suspenziji. Po dvodnevnem obdobju izražanja se celice suspendirajo v gojišču s selektivno snovjo in brez nje, da se določita število mutant (plošče za selekcijo) oziroma učinkovitost tvorbe klonov (plošče za viabilnost). Pri preskusu MLA obstajata dve enako sprejemljivi metodi kloniranja za selekcijo mutant; pri eni se na 96-jamičnih ploščah uporabi mehki agar, pri drugi pa tekoči medij (19) (38) (39). Kloniranje v TK6 se izvede s tekočim medijem in 96-jamičnimi ploščami (16).
39. Edina priporočena selektivna snov za mutante TK je trifluorotimidin (TFT) (61).
40. Pri preskusu MLA se plošče z agarjem in mikrotitrsko ploščo preštejejo po 10–12 dneh inkubacije. Pri preskusu TK6 se v kolonijah na mikrotitrskih ploščah po 10–14 dneh preštejejo zgodaj nastale mutante. Da se pridobijo počasi rastoče (pozno nastale) mutante TK6, je treba celice po preštetu zgodaj nastalih mutant znova napojiti z rastnim medijem in TFT ter nato plošče inkubirati še nadaljnjih 7–10 dni (62). Za razpravo v zvezi s štetjem počasi in normalno rastočih mutant TK glej odstavka 42 in 44.
41. Ustrezni izračuni za oba preskusa, vključno z obema metodama (z agarjem in mikrotitrsko ploščo), za preskus MLA so v Dodatku 2. Pri metodi MLA z agarjem se kolonije preštejejo, število mutiranih kolonij pa se prilagodi z učinkovitostjo tvorbe klonov, da se izračuna pogostnost mutant. Pri različici preskusov MLA in TK6 z mikrotitrsko ploščo se učinkovitost tvorbe klonov na ploščah za selekcijo in učinkovitost tvorbe klonov določi v skladu s Poissonovo porazdelitvijo (63). Pogostnost mutant se izračuna na podlagi teh dveh učinkovitosti tvorbe klonov.

Opredelitev lastnosti mutirane kolonije

42. Če da preskusna kemikalija pri preskusu MLA pozitiven rezultat (glej odstavek 62 in 63), je treba opredeliti lastnosti kolonij z razvrstitvijo kolonij po velikosti ali rasti pri vsaj eni od preskusnih kultur (običajno najvišja sprejemljiva pozitivna koncentracija) ter pri negativnih in pozitivnih kontrolnih vzorcih. Če da preskusna kemikalija negativen rezultat (glej odstavek 64), je treba opredeliti lastnosti mutirane kolonije pri negativnih in pozitivnih kontrolnih vzorcih. Pri metodi preskusa MLA z mikrotitrsko ploščo so mutante z majhnimi kolonijami opredeljene kot tiste, ki prekrivajo manj kot 25 % premera jamice, mutante z velikimi kolonijami pa kot tiste, ki prekrivajo več kot 25 % premera jamice. Pri metodi z agarjem se za štetje mutiranih kolonij in razvrstitev kolonij po velikosti uporablja avtomatski števec kolonij. Pristopi k razvrščanju kolonij po velikosti so podrobno opisani v virih (19) (38) (40). Opredelitev lastnosti kolonij pri negativnem in pozitivnem kontrolnem vzorcu je potrebna kot dokaz, da se študije izvajajo ustrezno.
43. Za preskusno kemikalijo ni mogoče ugotoviti, da daje negativen rezultat, če mutante z velikimi in majhnimi kolonijami niso ustrezno zaznane v pozitivnem kontrolnem vzorcu. Z opredelitvijo lastnosti kolonij se lahko zagotovijo splošne informacije v zvezi s sposobnostjo preskusne kemikalije, da povzroči točkovne mutacije in/ali kromosomske pojave (odstavek 4).
44. TK6: normalno rastoče in počasi rastoče mutante se razlikujejo po različnem času inkubacije (glej odstavek 40). Na splošno se pri TK6 zgodnje in pozno nastale mutante preštejejo v vseh kulturah, vključno z negativnimi in pozitivnimi kontrolnimi vzorci. Opredelitev lastnosti kolonij pri negativnem in pozitivnem kontrolnem vzorcu je potrebna kot dokaz, da se študije izvajajo ustrezno. Za preskusno kemikalijo ni mogoče šteti, da daje negativen rezultat, če zgodaj nastale in pozno nastale mutante v pozitivnem kontrolnem vzorcu niso ustrezno zaznane. Z opredelitvijo lastnosti kolonij se lahko zagotovijo splošne informacije v zvezi s sposobnostjo preskusne kemikalije, da povzroči točkovne mutacije in/ali kromosomske pojave (odstavek 4).

Usposobljenost laboratorija

45. Preden se začne laboratorij uporabljati za rutinsko preskušanje, mora izvesti sklop preskusov z referenčnimi pozitivnimi snovmi, ki delujejo z različnimi mehanizmi (vsaj ena aktivna s presnovno aktivacijo in ena aktivna brez presnovne aktivacije, izbrani med snovmi s seznama v preglednici 1), in različnimi negativnimi kontrolami (vključno z netretiranimi kulturami in različnimi topili/vehikli), s čimer dokaže, da ima zadostne izkušnje s preskusom. Ti odzivi pozitivnih in negativnih kontrol morajo biti skladni z viri. Ta zahteva ne velja za laboratorije, ki imajo izkušnje, tj. ki imajo na voljo zbirko podatkov iz preteklih preskusov, kot je opredeljena v odstavkih 47–50. Pri preskusu MLA morajo biti vrednosti, dobljene za pozitivni in negativni kontrolni vzorec, skladne s priporočili IWGT (glej preglednico 2).
46. Izbor snovi za pozitivno kontrolo (glej preglednico 1) je treba preiskati s kratkotrajnim in dolgotrajnim tretiranjem (če se uporablja dolgotrajno tretiranje) brez presnovne aktivacije ter kratkotrajnim tretiranjem ob presnovni aktivaciji, da se dokaže usposobljenost za odkrivanje mutagenih kemikalij, določi učinkovitost sistema presnovne aktivacije ter dokaže ustreznost pogojev za rast celic med tretiranjem, izražanjem fenotipa in selekcijo mutant ter dokaže ustreznost postopkov štetja. Izbrati je treba območje koncentracij izbranih kemikalij, kar omogoča ponovljiva in s koncentracijo povezana povečanja glede na ozadje, da se pokažeta občutljivost in dinamično območje preskusnega sistema.

Podatki o kontrolah iz preteklih preskusov

47. Laboratorij mora določiti:

- območje in porazdelitev pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov ter
- območje in porazdelitev negativnih kontrol (netretirane, topilo) iz preteklih preskusov.

48. Ko se podatki za porazdelitev negativnih kontrol iz preteklih preskusov pridobivajo prvič, morajo biti sočasne negativne kontrole skladne z objavljenimi podatki o negativnih kontrolah. Ko se k porazdelitvi kontrol doda več podatkov o preskusu, sočasne negativne kontrole po možnosti ne bi smele preseči 95-odstotne kontrolne meje za navedeno porazdelitev (64) (65).
49. Zbirka podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov mora sprva temeljiti na vsaj 10 preskusih, po možnosti pa mora biti sestavljena iz vsaj 20 preskusov, izvedenih v primerljivih preskusnih pogojih. Laboratoriji morajo uporabljati metode nadzora kakovosti, kot so kontrolne karte (npr. c-karte ali karte „X-črta“ (65)), da opredelijo, kako variabilni so njihovi podatki o pozitivnih in negativnih kontrolah, in pokažejo, da je metodologija v njihovem laboratoriju „pod nadzorom“ (66). Nadaljnje podrobnosti in priporočila o tem, kako zbrati in uporabiti podatke iz preteklih preskusov, so navedeni v virih (64).
50. V podatke o negativnih kontrolah je treba vključiti pogostnost mutant iz ene kulture ali po možnosti ponovljenih vzorcev kultur, kot je opisano v odstavku 27. Sočasne negativne kontrole po možnosti ne smejo preseči 95-odstotne kontrolne meje porazdelitve iz zbirke podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov. Kadar podatki o negativni kontroli presežejo 95-odstotno kontrolno mejo, jih je sprejemljivo vključiti v porazdelitev kontrol iz preteklih preskusov, če ti podatki niso izjemni osamelci ter če obstajata dokaz, da je preskusni sistem „pod nadzorom“ (glej odstavek 49), in dokaz o odsotnosti tehničnih ali človeških napak.
51. Vsako spremembo v protokolu poskusa je treba preučiti glede na skladnost z obstoječimi zbirkami podatkov laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov. Če se pojavijo večje neskladnosti, je treba ustvariti novo zbirko podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov.

PODATKI IN POROČANJE

Predstavitev rezultatov

52. Predstavitev podatkov za preskusa MLA in TK6 mora za tretirane in kontrolne kulture vključevati podatke, potrebne za izračun citotoksičnosti (relativna skupna rast (RTG) oziroma relativno preživetje (RS)) in pogostnosti mutant, kot je opisano v nadaljevanju.
53. Pri preskusu MLA je treba za posamezno kulturo zagotoviti podatke o relativni rasti v suspenziji (RSG), relativni skupni rasti (RTG), učinkovitosti tvorbe klonov ob selekciji mutant in številu mutiranih kolonij (za različico z agarjem) ali številu praznih jamic (za različico z mikrotitrsko ploščo). Pogostnost mutant je treba izraziti kot število mutiranih celic na milijon preživelih celic. Če je odziv pozitiven, je treba navesti pogostnosti mutant z majhnimi in velikimi kolonijami (in/ali delež skupne pogostnosti mutant) vsaj za eno koncentracijo preskusne kemikalije (običajno najvišja pozitivna koncentracija) ter negativno in pozitivno kontrolo. V primeru negativnega odziva je treba pogostnost mutant z majhnimi in velikimi kolonijami navesti za negativno in pozitivno kontrolo.
54. Pri preskusu TK6 je treba za posamezno kulturo zagotoviti podatke o relativnem preživetju (RS), učinkovitosti tvorbe klonov ob selekciji mutant in številu praznih jamic za zgodaj nastale in pozno nastale mutante. Pogostnost mutant je treba izraziti kot število mutiranih celic na število preživelih celic, vključevati pa mora skupno pogostnost mutant ter pogostnost mutant (in/ali delež skupne pogostnosti mutant) zgodaj nastalih in pozno nastalih mutant.

Merila za sprejemljivost

55. Pri preskusih MLA in TK6 morajo biti izpolnjena naslednja merila, preden se določijo splošni rezultati za posamezno preskusno kemikalijo:
- izvedena sta bila dva preskusna pogoja (kratkotrajno tretiranje s presnovno aktivacijo in brez nje – glej odstavke 33), razen če so bili pri enem dobljeni pozitivni rezultati;
 - analizirati mora biti mogoče ustrezno število celic in koncentracij (glej odstavke 27 in od 34 do 36);
 - merila za izbor najvišje koncentracije so skladna z merili, opisanimi v odstavkih od 28 do 30.

Merila za sprejemljivost negativnih in pozitivnih kontrol

56. Analiza obsežne količine podatkov o MLA, ki jo je opravila strokovna delovna skupina IWGT za MLA, je privedla do mednarodnega soglasja o posebnih merilih za sprejemljivost preskusa MLA (1) (2) (3) (4) (5). Zato ta preskusna metoda zagotavlja posebna priporočila za določanje sprejemljivosti negativnih in pozitivnih kontrol ter za ocenjevanje rezultatov posameznih snovi pri preskusu MLA. Preskus TK6 ima veliko manjšo zbirko podatkov in ga delovna skupina ni ocenila.
57. Pri preskusu MLA je treba za vsak poskus oceniti, ali netretirana kontrola/kontrola s topilom izpolnjuje merila za sprejemljivost delovne skupine IWGT za MLA ((4) in preglednica 2 v nadaljevanju) v zvezi s: (1) pogostnostjo mutant (upoštevati je treba, da so pogostnosti mutant, sprejemljive po IWGT, različne za različici preskusa MLA z agarjem in mikrotitrsko ploščo), (2) učinkovitostjo tvorbe klonov ob selekciji mutant in (3) rastjo v suspenziji za kontrolo s topilom (za formule glej Dodatek 2).

*Preglednica 2***Merila za sprejemljivost preskusa MLA**

Parameter	Metoda z mehkim agarjem	Metoda z mikrotitrsko ploščo
Pogostnost mutant	$35-140 \times 10^{-6}$	$50-170 \times 10^{-6}$
Učinkovitost tvorbe klonov	65–120 %	65–120 %
Rast v suspenziji	8–32-kratna (3–4-urno tretiranje) 32–80-kratna (24-urno tretiranje, če se izvede)	8–32-kratna (3–4-urno tretiranje) 32–80-kratna (24-urno tretiranje, če se izvede)

58. Pri preskusu MLA je treba za vsak preskus oceniti tudi, ali pozitivne kontrole izpolnjujejo vsaj eno od naslednjih dveh meril za sprejemljivost, ki ju je razvila delovna skupina IWGT:

- pri pozitivni kontroli je treba dokazati absolutno povečanje skupne pogostnosti mutant, tj. povečanje nad spontano pogostnost mutant v ozadju (inducirana pogostnost mutant), ki znaša vsaj 300×10^{-6} . Vsaj 40 % inducirane pogostnosti mutant se mora kazati v pogostnosti mutant v majhni koloniji;
- pozitivna kontrola ima povečano pogostnost mutant v majhni koloniji, ki znaša vsaj 150×10^{-6} nad tisto v sočasni netretirani kontroli/kontroli s topilom (inducirana pogostnost mutant v majhni koloniji znaša 150×10^{-6}).

59. Preskus TK6 je sprejemljiv, če se podatki o sočasni negativni kontroli štejejo kot sprejemljivi za vključitev v zbirko podatkov laboratorija o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov, kot je opisano v odstavkih 48 in 49. Poleg tega morajo sočasne pozitivne kontrole (glej odstavek 32) povzročiti odzive, ki so skladni z odzivi iz zbirke podatkov o pozitivnih kontrolah iz preteklih preskusov, in statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo.

60. Pri obeh preskusih mora biti zgornja meja citotoksičnosti, opažene v pozitivni kontrolni kulturi, enaka kot pri poskusnih kulturah. To pomeni, da relativna skupna rast (RTG)/relativno preživetje (RS) ne sme biti manjše od 10 %. Zadostuje, da se uporabi ena koncentracija (ali ena od koncentracij pozitivnih kontrolnih kultur, če se uporabi več kot ena koncentracija) za dokaz, da so izpolnjena merila za sprejemljivost pozitivne kontrole. Dalje, pogostnost mutant v pozitivni kontroli mora biti znotraj sprejemljivega območja, določenega za laboratorij.

Vrednotenje in razlaga rezultatov

61. Za preskus MLA je pomembno delo o biološki pomembnosti in merilih za pozitivni odziv opravila strokovna delovna skupina IWGT za limfom miši (4). Zato ta preskusna metoda zagotavlja specifična priporočila za razlago rezultatov preskusne kemikalije pri preskusu MLA (glej odstavke od 62 do 64). Preskus TK6 ima veliko manjšo zbirko podatkov in ga delovna skupina ni ocenila. Zato so priporočila za razlago podatkov za preskus TK6 splošnejša (glej odstavek 65 in 66). Za oba preskusa veljajo dodatna priporočila (glej odstavke od 67 do 71).

MLA

62. Priporočen je pristop za opredelitev pozitivnih in negativnih odzivov, ki zagotavlja, da je povečana pogostnost mutant biološko pomembna. Namesto statistične analize, ki se običajno uporablja pri drugih preskusih, temelji na uporabi vnaprej določene inducirane pogostnosti mutant (tj. povečanje pogostnosti mutant nad sočasno kontrolo), imenovane splošni ocenjevalni faktor (Global Evaluation Factor (GEF)), ki temelji na analizi porazdelitve podatkov o pogostnosti mutant pri negativni kontroli, pridobljenih od sodelujočih laboratorijev (4). Pri različici preskusa MLA z agarjem GEF znaša 90×10^{-6} , pri različici preskusa MLA z mikrotitrsko ploščo pa GEF znaša 126×10^{-6} .

63. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje kot jasno pozitivna, če v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 33) povečanje pogostnosti mutant nad hkratno ozadje presega GEF in je povečanje povezano s koncentracijo (npr. z uporabo trendnostnega testa). Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da lahko povzroči nastanek mutacij v tem preskusnem sistemu.

64. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 33) ni odziva, povezanega s koncentracijo, ali pa če v primeru povečanja pogostnosti mutant ta ne presega GEF. Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da ne more povzročiti nastanka mutacij v tem preskusnem sistemu.

TK6

65. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno pozitivno, če se v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 33):

- pri vsaj eni od preskusnih koncentracij pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- pojavi povečanje, povezano z odmerkom, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom (glej odstavek 33);
- pojavijo rezultati zunaj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 48).

Ko so izpolnjena vsa ta merila, se nato šteje, da lahko preskusna kemikalija povzroči nastanek mutacij v tem preskusnem sistemu. Priporočila glede najustreznejših statističnih metod so navedena v virih (66) (67).

66. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za jasno negativno, če se v katerem koli od preučevanih preskusnih pogojev (glej odstavek 33):

- pri nobeni od preskusnih koncentracij ne pokaže statistično značilno povečanje v primerjavi s sočasno negativno kontrolo;
- ne pojavi povečanje, povezano s koncentracijo, kadar se ocenjuje z ustreznim trendnostnim testom;
- vsi rezultati nahajajo znotraj porazdelitve podatkov o negativnih kontrolah iz preteklih preskusov (npr. 95-odstotna kontrolna meja, ki temelji na Poissonovi porazdelitvi; glej odstavek 48).

Za preskusno kemikalijo se nato šteje, da ne more povzročiti nastanka mutacij v tem preskusnem sistemu.

Za preskusa MLA in TK6:

67. Če največja koncentracija temelji na citotoksičnosti, si je treba pri najvišji koncentraciji prizadevati za od 20- do 10-odstotno relativno skupno rast (RTG)/relativno preživetje (RS). Enotno stališče je, da je potrebna pazljivost pri razlagi pozitivnih rezultatov, ki znašajo samo med 20 in 10 % relativne skupne rasti (RTG)/relativnega preživetja (RS), rezultat pa se ne bi štel za pozitiven, če bi se povečanje pogostnosti mutant pojavilo samo pri 10-odstotni relativni skupni rasti/relativnim preživetjem ali pod tem pragom (če je ocenjeno) (2) (59).

68. V nekaterih okoliščinah so lahko dodatne informacije v pomoč pri določitvi, da preskusna kemikalija ni mutagena, če ni kulture, pri kateri bi vrednost relativne skupne rasti (RTG) znašala 10–20 % relativne skupne rasti/relativnega preživetja. Ti primeri so predstavljeni v nadaljevanju: (1) ni dokazov o mutagenosti (npr. ni odziva na odmerek, ni pogostnosti mutant nad tistimi pri sočasni negativni kontroli ali razponi pri preteklih preskusih v ozadju itd.) v nizu podatkovnih točk znotraj od 100- do 20-odstotne relativne skupne rasti/relativnega preživetja, obstaja pa tudi vsaj ena podatkovna točka med 20- in 25-odstotno relativno skupno rastjo/relativnim preživetjem; (2) ni dokazov o mutagenosti (npr. ni odziva na odmerek, ni pogostnosti mutant nad tistimi pri sočasni negativni kontroli ali razponi pri preteklih preskusih v ozadju itd.) v nizu podatkovnih točk med 100- in 25-odstotno relativno skupno rastjo/relativnim preživetjem, obstaja pa tudi negativna podatkovna točka rahlo pod 10-odstotno relativno skupno rastjo/relativnim preživetjem. V obeh teh primerih je mogoče sklepati, da je preskusna kemikalija negativna.

69. Preverjanje jasno pozitivnega ali jasno negativnega odziva ni potrebno.

70. Če odziv ni niti jasno negativen niti jasno pozitiven, kot je opisano zgoraj, in/ali za podporo pri ugotavljanju biološke pomembnosti rezultatov, je treba podatke oceniti s strokovno presojo in/ali nadaljnjimi preiskavami. Ponovitev poskusa je lahko koristna, tako da se po možnosti uporabijo spremenjeni poskusni pogoji (npr. razmik med koncentracijami za povečanje verjetnosti, da bodo dosežene podatkovne točke v razponu od 10- do 20-odstotne relativne skupne rasti/relativnega preživetja, z uporabo drugih pogojev za presnovno aktivacijo (tj. koncentracija ali izvor S9) in trajanja tretiranja).

71. Zbirka podatkov v redkih primerih celo po izvedbi nadaljnjih preiskav onemogoča sprejetje sklepa o pozitivnih ali negativnih rezultatih. Zato je treba zaključiti, da je odziv na preskusno kemikalijo dvoumen (kar pomeni, da je enako verjetno pozitiven ali negativen).

POROČILO O PRESKUSU

72. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija:

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;
- meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

Snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Topilo:

- utemeljitev izbire topila;
- delež topila v končnem gojišču.

Celice:

za laboratorijske izvirne kulture:

- vrsta in izvor celic ter pretekli rezultati v preskuševalnem laboratoriju;
- lastnosti kariotipa in/ali modalno število kromosomov;
- metode vzdrževanja celičnih kultur;
- odsotnost mikoplazem;
- podvojitveni čas celic.

Preskusni pogoji:

- razlogi za izbiro koncentracij in števila celičnih kultur, vključno z npr. podatki o citotoksičnosti in mejah topnosti;

- sestava gojišča, koncentracija CO₂, stopnja vlažnosti;
- koncentracija preskusne kemikalije, izražena kot končna koncentracija v gojišču (npr. v µg ali mg/ml ali mM gojišča);
- koncentracija (in/ali količina) topila in preskusne kemikalije, ki se dodata v gojišče;
- temperatura inkubacije;
- čas inkubacije;
- trajanje tretiranja;
- gostota celic med tretiranjem;
- vrsta in sestava sistema presnovne aktivacije (vir S9, način priprave zmesi S9, koncentracija ali količina zmesi S9 in S9 v končnem gojišču, nadzor kakovosti S9);
- snovi pozitivne in negativne kontrole, končne koncentracije za vsak pogoj tretiranja;
- dolžina časa izražanja (skupaj s številom nasajenih celic ter programom kultiviranja na novem gojišču in dodajanja hranil, če je to primerno);
- identiteta selektivne snovi in njena koncentracija;
- pri preskusu MLA je treba navesti uporabljeno različico (z agarjem ali mikrotitrsko ploščo);
- merila za sprejemljivost preskusov;
- uporabljene metode za določanje števila viabilnih in mutiranih celic;
- uporabljene metode za merjenje citotoksičnosti;
- vsi dodatni podatki, pomembni za citotoksičnost in uporabljeno metodo;
- trajanje inkubacije po nasaditvi na ploščo;
- opredelitev, katera velikost in tip kolonij se upoštevata (vključno z merili za ‚majhne‘ in ‚velike‘ kolonije, če je to primerno);
- merila za obravnavanje študij kot pozitivnih, negativnih ali dvoumnih;
- uporabljene metode za določitev vrednosti pH, osmolarnosti, če se opravi, in obarjanja, če je ustrezno.

Rezultati:

- število tretiranih celic in število celic, kultiviranih na novem gojišču, za vsako kulturo;
- parametri toksičnosti (relativna skupna rast za MLA in relativno preživetje za TK6);
- znaki obarjanja in čas odkritja;
- število celic, nasajenih v selektivno in neselektivno gojišče;

- število kolonij v neselektivnem gojišču in število odpornih kolonij v selektivnem gojišču ter s tem povezani pogostnosti mutant;
- razvrščanje kolonij po velikosti pri negativni in pozitivni kontroli, ter če je preskusna kemikalija pozitivna, vsaj ena koncentracija in s tem povezane pogostnosti mutant;
- razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;
- podatki o sočasnih negativnih (s topilom) in pozitivnih kontrolah (koncentracije in topila);
- podatki o pretekli negativni (topilo) in pozitivni kontroli (koncentracije in topila) z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni; število preskusov, na katerih temeljijo pretekle kontrole;
- statistične analize (za posamezne kulture in združene ponovljene vzorce, če je ustrezno) in p-vrednosti, če obstajajo; in pri MLA ocena GEF.

Razprava o rezultatih

Sklepna ugotovitev

VIRI

- (1) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J. (poročevalec), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H., in Stankowski, L. F., Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185–190.
- (2) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H., in Stankowski, L. F., Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (april 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292–299.
- (3) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L. F., Jr., Thakur, A., Wakuri, S., in Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127–140.
- (4) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L. F., Jr., Thakur, A. K., Van Goethem, F., Wakuri, S., in Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1–5.
- (5) Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D. A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L. F., Jr., Thakur, A. K., in Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36–40.
- (6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, št. 234, OECD, Pariz.

- (7) Fellows, M. D., Luker, T., Cooper, A., in O'Donovan, M. R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. *Mutation, Res.*, 746 (1): 21–28.
- (8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T., in Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. *Mutation Res.*, 493 (1–2): 101–114.
- (9) Wang, J., Sawyer, J. R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N., in Moore, M. M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol. Sci.*, 109 (1): 96–105.
- (10) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A., in Hozier, J. C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. National. Academy. Sci. USA*, 87 (1): 51–55.
- (11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B., in Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK⁺ Leads to TK⁻ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, *Mutation Res.*, 84 (1): 169–181.
- (12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D., in Moore, M. M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK⁻ Mutants Early in their Clonal History, *Mutation Res.*, 147 (5): 237–242.
- (13) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T., in Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT^r) Mutants of L5178Y/TK⁺ Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): 161–174.
- (14) Liber, H. L., Call, K. M., in Little, J. B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 178 (1): 143–153.
- (15) Li, C. Y., Yandell, D. W., in Little, J. B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18 (1): 77–87.
- (16) Honma, M., Hayashi, M., in Sofuni, T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation. Res.*, 374 (1): 89–98.
- (17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J. B., Sofuni, T., in Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinogen.*, 28 (4): 203–14.
- (18) Amundson, S. A., in Liber, H. L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. *Mutation Res.*, 267 (1): 89–95.
- (19) Schisler, M. R., Moore, M. M., in Gollapudi, B. B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK⁺ –3.7.2C) Forward Mutation Assay. In *Protocols in Genotoxicity Assessment* A. Dhawan and M. Bajpayee (ur.), Springer Protocols, Humana Press: 27–50.
- (20) Long, L. H., Kirkland, D., Whitwell, J., in Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634 (1–2): 177–183.
- (21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I., in Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): 439–452.
- (22) Brusick, D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. *Environ. Mutagen.*, 8 (6): 879–886.

- (23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I., in Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268 (2): 297–305.
- (24) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Jr., Brusick, D., Ashby, J., in Myhr, B. C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257: 147–204.
- (25) Wang, J., Heflich, R. H., in Moore, M. M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. *Mutation Res.*, 626 (1-2): 185–190.
- (26) Fischer, G. A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 76: 673–680.
- (27) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G., in Brown, M. M. M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK⁺/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutation Res.*, 59(1): 61–108.
- (28) Sawyer, J., Moore, M. M., Clive, D., in Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK⁺/– 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 147 (5): 243–253.
- (29) Sawyer, J. R., Moore, M. M., in Hozier, J. C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK⁺/– Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): 181–193.
- (30) Sawyer, J. R., Binz, R. L., Wang, J., in Moore, M. M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK⁺/– 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (2): 127–131.
- (31) Fellows, M. D., McDermott, A., Clare, K. R., Doherty, A., in Aardema, M. J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y TK⁺/– Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 55 (1): 35–42.
- (32) Storer, R. D., Jraynak, A. R., McKelvey, T. W., Elia, M. C., Goodrow, T. L., in DeLuca, J. G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y TK⁺/– Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. *Mutation. Res.*, 373 (2): 157–165.
- (33) Clark, L. S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S. H., in Moore, M. M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mutagen.*, 19 (4): 263–268.
- (34) Skopek, T. R., Liber, H. L., Penman, B. W., in Thilly, W. G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84 (2): 411–416.
- (35) Honma, M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45 (2-3): 162–176.
- (36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y. H., Tsang, N. M., Yandell, D. W., Kelsey, K. T., in Liber, H. L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. *Cancer. Res.*, 55 (1): 12–15.
- (37) Lorge, E., Moore, M., Clements, J., Donovan, M. O., Honma, M., Kohara, A., van Benthem, J., Galloway, S., Armstrong, M. J., Thybaud, V., Gollapudi, B., Aardema, M., Kim, J., Sutter, A., in Kirkland, D. J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Rokopis v pripravi).

- (38) Lloyd, M., in Kidd, D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ur. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35–54.
- (39) Mei, N., Guo, X., in Moore, M. M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. V: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan, Z., in Caldwell (ur.) , 2. izdaja, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- (40) Liber, H. L., in Thilly, W. G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid human Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94 (2): 467–485.
- (41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O. W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G., in Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *ATLA*, 33 (3): 261–287.
- (42) Moore, M. M., in Howard, B. E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, *Mutation Res.*, 104 (4-5): 287–294.
- (43) Ames, B. N., McCann, J., in Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31 (6): 347–364.
- (44) Maron, D. M., in Ames, B. N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113 (3-4): 173–215.
- (45) Natarajan, A. T., Tate, A. D., Van Buul, P. P. W., Meijers, M., in De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37 (1): 83–90.
- (46) Matsuoka, A., Hayashi, M., in Ishidate, M., Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66 (3): 277–290.
- (47) Ong, T. M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55–65.
- (48) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M., in Wolf, R. C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.*, 7 (3): 175–177.
- (49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K., in Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. V: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F. J., *et al.* (ur.), Elsevier, North-Holland, str. 85–88.
- (50) Galloway, S. M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312 (3): 241–261.
- (51) Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R., in Galloway, S. M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28 (1): 51–59.
- (52) UNEP (2001). Stockholmska konvencija o obstojnih organskih onesnaževalih, Program Združenih narodov za okolje (UNEP).

- (53) Krahn, D. F., Barsky, F. C., in McCooey, K. T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. V: Genotoxic Effects of Airborne Agents, Tice, R. R., Costa, D. L., in Schaich, K. M. (ur.) New York, Plenum, str. 91–103.
- (54) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P., in Brooks, A. L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795–801.
- (55) Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Arito, H., Fukushima, S., in Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122–130.
- (56) Arlett, C. F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. V: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D. J. (ur.), Cambridge University Press, str. 66–101.
- (57) Morita, T., Honma, M., in Morikawa, K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32–56.
- (58) Brookmire, L., Chen, J. J., in Levy, D. D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36–43.
- (59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Na voljo na: [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (60) Honma, M., in Hayashi, M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373–384.
- (61) Moore-Brown, M. M., Clive, D., Howard, B. E., Batson, A. G., in Johnson, K. O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK^{-/-}) Mutants from L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363–378.
- (62) Liber, H. L., Yandell, D. W., in Little, J. B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9–17.
- (63) Furth, E. E., Thilly, W. G., Penman, B. W., Liber, H. L., in Rand, W. M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1–8.
- (64) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J., in Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87–90.
- (65) Ryan, T. P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York, 2. izdaja.
- (66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 199), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (67) Fleiss, J. L., Levin, B., in Paik, M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3. izdaja, New York: John Wiley & Sons.

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Anevgen: vsaka kemikalija ali proces, na podlagi katerega pride do aneuploidije v celicah ali organizmih zaradi reagiranja z elementi mitotskega in mejoznega cikla delitve celic.

Aneuploidija: vsako odstopanje od normalnega diploidnega (ali haploidnega) števila kromosomov za en ali več kot en kromosom, vendar ne za celotni set kromosomov (poliploidija).

Mutageni substitucije baznih parov: kemikalije, ki povzročijo zamenjavo baznih parov v DNK.

Kemikalija: snov ali zmes.

Učinkovitost tvorbe klonov: delež celic, nasajenih na ploščo pri nizki gostoti in sposobnih zrasti v kolonijo, ki jo je mogoče prešteti.

Klastogen: vsaka kemikalija ali proces, ki povzroči strukturne kromosomske aberacije v populacijah celic ali organizmih.

Citotoksičnost: za poskuse, zajete v tej preskusni metodi, je citotoksičnost opredeljena kot zmanjšanje relativne skupne rasti ali relativnega preživetja pri preskusu MLA oziroma preskusu TK6.

Napredna mutacija: genska mutacija starševskega tipa mutirane oblike, ki povzroči spremembo ali izgubo encimskega delovanja ali funkcije kodiranega proteina.

Mutageni premika bralnega okvira: kemikalije, ki povzročijo adicijo ali delecijo enega ali več baznih parov v molekuli DNK.

Genotoksično: splošni izraz, ki zajema vse poškodbe DNK ali kromosomov, vključno s prelomi DNK, adukti, prerazporeditvami, mutacijami, aberacijami kromosomov in aneuploidijo. Vsi genotoksični učinki ne povzročijo nastanka mutacij ali trajnih kromosomskih poškodb.

Mitotična rekombinacija: med mitozo rekombinacija med homolognimi kromatidi, ki lahko povzroči indukcijo prelomov dvojne vijačnice DNK ali izgubo heterozigotnosti.

Mutageno: povzroča dedno spremembo zaporedij baznih parov DNK v genih ali strukture kromosomov (kromosomske aberacije).

Pogostnost mutant: število opaženih mutiranih celic, deljeno s številom viabilnih celic.

Čas izražanja fenotipa: čas po tretiranju, v katerem je genetsko spreminjanje fiksno znotraj genoma, vsi morebitni predhodno obstoječi genski produkti pa se odstranijo, tako da se spremeni fenotipska lastnost.

Relativno preživetje: relativno preživetje se uporablja kot merilo za citotoksičnost, povezano s tretiranjem, pri preskusu TK6. Pomeni relativno učinkovitost tvorbe klonov celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju celic, prilagojeno z morebitno izgubo celic med tretiranjem, v primerjavi z učinkovitostjo tvorbe klonov pri negativni kontroli.

Relativna rast v suspenziji: pri preskusu MLA relativna skupna dvodnevna rast preskusne kulture v suspenziji v primerjavi s skupno dvodnevno rastjo negativne kontrole/kontrole s topilom v suspenziji (Clive in Spector, 1975). Relativna rast v suspenziji mora vključevati relativno rast preskusne kulture v primerjavi z negativno kontrolo/kontrolo s topilom v obdobju tretiranja.

Relativna skupna rast: relativna skupna rast se uporablja kot merilo za citotoksičnost, povezano s tretiranjem, pri preskusu MLA. Je merilo relativne (glede na kontrolo z vehiklom) rasti preskusnih kultur med fazami kloniranja v preskusu, ki obsegajo tretiranje, dvodnevno izražanje in selekcijo mutant. Relativna rast vsake preskusne kulture v suspenziji se pomnoži z relativno učinkovitostjo tvorbe klonov pri preskusni kulturi ob selekciji mutant in izrazi glede na učinkovitost tvorbe klonov pri negativni kontroli/kontroli s topilom (Clive in Spector, 1975).

Frakcije S9, pripravljene iz jeter: supernatant iz homogenata jeter po centrifugiranju pri 9 000 g, tj. izvleček surovih jeter.

Mešanica S9: mešanica frakcije S9, pripravljene iz jeter, in kofaktorjev, potrebnih za dejavnosti presnovnih encimov.

Rast v suspenziji: stopnja povečanja števila celic med fazama tretiranja in izražanja pri preskusu MLA. Rast v suspenziji se izračuna tako, da se pri kratkotrajnem (3- ali 4-urnem) tretiranju stopnja povečanja prvega dne pomnoži s stopnjo povečanja drugega dne. Če se uporabi 24-urno tretiranje, je rast v suspenziji stopnja povečanja med 24-urnim tretiranjem, pomnožena s stopnjami povečanja prvi in drugi dan izražanja.

Kontrola s topilom: splošni pojem za opredelitev kontrolnih kultur, ki prejmejo samo topilo, uporabljeno za raztopitev preskusne kemikalije.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Netretirane kontrole: netretirane kontrole so kulture, ki se ne tretirajo (tj. niti s preskusno kemikalijo niti s topilom), temveč se tretirajo enako kot kulture, v katere se doda preskusna kemikalija.

Dodatek 2

FORMULE

Citotoksičnost

Za obe različici preskusa MLA (z agarjem in mikrotitrsko ploščo)

Citotoksičnost je opredeljena kot relativna skupna rast (RTG – Relative Total Growth), ki vključuje relativno rast v suspenziji (RSG – Relative Suspension Growth) v dvodnevem obdobju izražanja in relativno učinkovitost tvorbe klonov (RCE – Relative Cloning Efficiency), dobljeno ob selekciji mutant. RTG, RSG in RCE se izrazijo kot deleži.

Izračun RSG: Rast v suspenziji ena (SG_1) je hitrost rasti med dnevom 0 in dnevom 1 (koncentracija celic na dan 1/koncentracija celic na dan 0), rast v suspenziji dve (SG_2) pa je hitrost rasti med dnevom 1 in dnevom 2 (koncentracija celic na dan 2/koncentracija celic na dan 1). RSG je skupna SG ($SG_1 \times SG_2$) za tretirano kulturo v primerjavi z netretirano kontrolo/kontrolo s topilom. To je: $RSG = [SG_{1(preskus)} \times SG_{2(preskus)}] / [SG_{1(kontrola)} \times SG_{2(kontrola)}]$ SG_1 je treba izračunati iz začetne koncentracije celic, ki se uporabi ob začetku tretiranja celic. To pomeni morebitno razliko v citotoksičnosti, ki se v celičnih kulturah pojavi med tretiranjem celic.

RCE (Relative Cloning Efficiency) je relativna učinkovitost tvorbe klonov v preskusni kulturi v primerjavi z relativno učinkovitostjo tvorbe klonov v netretirani kontroli/kontroli s topilom, dobljeno ob selekciji mutant.

Relativna skupna rast (RTG): $RTG = RSG \times RCE$

TK6

Relativno preživetje (RS – Relative Survival):

Citotoksičnost se oceni z relativnim preživetjem, tj. učinkovitostjo tvorbe klonov (CE) celic, nasajenih na ploščo takoj po tretiranju, prilagojeno z morebitno izgubo celic med tretiranjem, v primerjavi z učinkovitostjo tvorbe klonov pri negativnih kontrolah (ki se jim pripiše 100-odstotno preživetje). Prilagoditev zaradi izgube celic med tretiranjem se lahko izračuna kot:

$$\text{Prilagojena CE} = CE \times \frac{\text{število celic na koncu tretiranja}}{\text{število celic na začetku tretiranja}}$$

RS za kulturo, tretirano s preskusno kemikalijo, se izračuna kot:

$$RS = \frac{\text{prilagojena CE v tretirani kulturi}}{\text{prilagojena CE v kontroli s topilom}} \times 100$$

Pogostnost mutant pri preskusih MLA in TK6

Pogostnost mutant (MF – Mutant Frequency) je učinkovitost tvorbe klonov v mutiranih kolonijah v selektivnem gojišču (CE_M), prilagojena z učinkovitostjo tvorbe klonov v neselektivnem gojišču ob selekciji mutant (CE_V). Torej, $MF = CE_M / CE_V$. Izračun teh dveh učinkovitosti tvorbe klonov je v nadaljevanju opisan za metodo kloniranja z agarjem in z mikrotitrsko ploščo.

Različica preskusa MLA z agarjem: pri različici preskusa MLA z agarjem se število kolonij na plošči za selekcijo mutant (C_M) in število kolonij na neselektivni plošči ali plošči za učinkovitost tvorbe klonov (štetje viabilnih celic) (C_V) dobita z neposrednim štetjem klonov. Ko se nasadi 600 celic za učinkovitost tvorbe klonov (CE) na plošče za selekcijo mutant (CE_M) in neselektivne plošče ali plošče za učinkovitost tvorbe klonov (štetje viabilnih) (CE_V) in se za selekcijo mutant uporabi 3×10^6 celic,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

Različica preskusov MLA in TK6 z mikrotitrsko ploščo: pri različici preskusa MLA z mikrotitrsko ploščo se C_M in C_V določita kot zmnožek skupnega števila mikrojamic (TW) in verjetnega števila kolonij na jamico (P) na mikrotitrskih ploščah.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Od ničte Poissonove porazdelitve (Furth et al., 1981) je P podan kot

$$P = -\ln (EW/TW)$$

Pri čemer je EW število praznih jamic, TW pa število vseh jamic. Zato

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Pri različici preskusa MLA z mikrotitrsko ploščo se enako izračunajo pogostnosti mutant z majhnimi in velikimi kolonijami, tako da se uporabi ustrezno število praznih jamic za majhne in velike kolonije.

Pri preskusu TK6 pogostnosti mutant z majhnimi in velikimi kolonijami temeljijo na zgodaj nastalih in pozno nastalih mutantah.

B.68 IN VITRO PRESKUSNA METODA KRATKOTRAJNE IZPOSTAVLJENOSTI ZA OPREDELITEV (i) KEMIKALIJ, KI POVZROČAJO HUDE POŠKODBE OČI, IN (ii) KEMIKALIJ, KI JIH NI TREBA RAZVRSTITI GLEDE NA DRAŽENJE OČI ALI HUDE POŠKODBE OČI

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 491 (2017). Preskusna metoda kratkotrajne izpostavljenosti (Short Time Exposure – STE) je metoda *in vitro*, ki se lahko uporabi v določenih okoliščinah in s posebnimi omejitvami za razvrstitev glede na nevarnost in označevanje kemikalij (snovi in zmesi), ki povzročajo hude poškodbe oči, in tistih, ki jih ni treba razvrstiti glede na hude poškodbe oči ali draženje oči, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) (1).
2. Že vrsto let se potencialna nevarnost kemikalij za oči ocenjuje predvsem z uporabo preskusa draženja oči *in vivo* na kuncih (preskusna metoda B.5 (8), ki je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 405). Na splošno velja, da *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih v bližnji prihodnosti ne bo mogoče v celoti nadomestiti z enim samim alternativnim preskusom *in vitro*, da bi se predvidel celoten razpon hudih poškodb oči/učinkov draženja oči za različne kemijske razrede. Strateške kombinacije alternativnih preskusnih metod, uporabljenih pri (večstopenjski) strategiji preskušanja, pa bi morda lahko v celoti nadomestile preskus draženja oči na kuncih (2). Pristop od zgoraj navzdol je zasnovan za preskušanje kemikalij, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da bo imela kemikalija visok potencial draženja ali da bo povzročila hude poškodbe oči. Nasprotno pa je pristop od spodaj navzgor zasnovan za preskušanje kemikalij, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da kemikalija ne bo povzročila tolikšnega draženja oči, da bi jo bilo treba razvrstiti. Čeprav se preskusna metoda STE ne obravnava kot celovit nadomestek za *in vivo* preskus draženja oči na kuncih, je primerna za uporabo kot del večstopenjske strategije preskušanja za regulativno razvrščanje in označevanje, kot je pristop od zgoraj navzdol/od spodaj navzgor, da se brez dodatnega preskušanja opredelijo (i) kemikalije, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP), in (ii) kemikalije (pri čemer so izključene zelo hlapne snovi in vse trdne kemikalije, razen površinsko aktivnih snovi), ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP) (1)(2). Vendar bi bilo treba kemikalijo, za katero se s preskusno metodo STE ne napove, da povzroča hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) niti da spada med snovi brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP (ne povzroča niti hudih poškodb oči niti draženja oči), dodatno preskusiti, da se določi končna razvrstitev. Poleg tega se je treba pred uporabo pristopa od spodaj navzgor pri preskusni metodi STE v okviru drugih sistemov za razvrščanje, ki niso GHS ZN/uredba CLP, posvetovati z ustreznimi regulativnimi organi. Izbiro najustreznejše preskusne metode in uporabo te preskusne metode je treba obravnavati v okviru smernice OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi s hudimi poškodbami oči in draženjem oči (14).
3. V tej preskusni metodi so opisani postopki za oceno potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči glede na njeno zmožnost, da pri preskusni metodi kratke izpostavljenosti povzroči citotoksičnost. Citotoksični učinek kemikalij na epitelne celice roženice je pomemben način delovanja, ki povzroča poškodbe roženičnega epitelija in draženje oči. Viabilnost celic se pri preskusni metodi STE oceni s kvantitativnim merjenjem – po ekstrakciji iz celic – soli modrega formazana, ki jo žive celice proizvedejo z encimsko pretvorbo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), znanega tudi kot tiazolil modro tetrazol bromid (3). Dobljena viabilnost celic se primerja s kontrolo s topilom (relativna viabilnost) in uporabi za oceno potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči. Preskusna kemikalija se razvrsti v kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP, če 5-odstotna in 0,05-odstotna koncentracija povzroči največ ($\leq$) 70-odstotno viabilnost celic. Nasprotno pa se za kemikalijo predvideva, da je brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP, če 5-odstotna in 0,05-odstotna koncentracija povzroči več kot ($>$) 70-odstotno viabilnost celic.
4. Pojem 'preskusna kemikalija' se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša, in ni povezan z uporabnostjo preskusne metode STE za preskušanje snovi in/ali zmesi. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

5. Ta preskusna metoda temelji na protokolu, ki ga je razvila družba Kao Corporation (4) in je bil predmet dveh različnih validacijskih študij: eno je izvedel validacijski odbor japonske družbe za alternative poskusom na živalih

(1) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 13.12.2008, str. 1).

(JSAAE) (5), drugo pa japonski center za validacijo alternativnih metod (JaCVAM) (6). Medsebojni strokovni pregled sta izvedla NICEATM/ICCVAM na podlagi poročil o validacijskih študijah in dokumentov o pregledu ozadja v zvezi s preskusno metodo (7).

6. Ko je bila preskusna metoda STE uporabljena za opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) (1), so podatki, pridobljeni za 125 kemikalij (med katerimi so bile snovi in zmesi), pokazali 83-odstotno splošno točnost (104/125), 1-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (1/86) in 51-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (20/39) v primerjavi z *in vivo* preskusom draženja oči na kuncih (7). Delež lažno negativnih rezultatov v tem primeru ni ključen, saj se vse preskusne kemikalije, ki povzročajo viabilnost celic $\leq 70\%$ pri 5-odstotni koncentraciji in $> 70\%$ pri 0,05-odstotni koncentraciji, naknadno preskusijo še z drugimi ustrezno validiranimi preskusnimi metodami *in vitro* ali – kot zadnja možnost – z *in vivo* preskusom draženja oči na kuncih, in sicer glede na regulativne zahteve ter v skladu s trenutno priporočeno strategijo zaporednega preskušanja in pristopi, ki temeljijo na zanesljivosti dokazov (1) (8). V glavnem so bile preskušene snovi iz ene sestavine, čeprav obstaja tudi omejena količina podatkov o preskušanju zmesi. Preskusna metoda je kljub temu tehnično ustrezna tudi za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi. Preden pa se ta preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Preskusna metoda STE ni pokazala drugih posebnih pomanjkljivosti, ko je bila uporabljena za opredelitev preskusnih kemikalij kot kemikalij kategorije 1 po GHS ZN/uredbi CLP. Raziskovalci lahko razmislijo o uporabi te preskusne metode za preskusne kemikalije, pri čemer je treba viabilnost celic $\leq 70\%$ pri 5-odstotni in tudi 0,05-odstotni koncentraciji sprejeti kot kazalnik za odziv, ki povzroča hude poškodbe oči in ga je treba brez nadaljnega preskušanja razvrstiti v kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP.
7. Ko je bila preskusna metoda STE uporabljena za opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči in hude poškodbe oči (tj. brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP), so podatki, pridobljeni za 130 kemikalij (med katerimi so bile snovi in zmesi), pokazali 85-odstotno splošno točnost (110/130), 12-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (9/73) in 19-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (11/57) v primerjavi z *in vivo* preskusom draženja oči na kuncih (7). Če se iz podatkovnega niza izključijo zelo hlapne snovi in trdne snovi, razen površinsko aktivnih, se splošna točnost izboljša na 90 % (92/102), delež lažno negativnih rezultatov na 2 % (1/54), delež lažno pozitivnih rezultatov pa na 19 % (9/48) (7). Posledično sta potencialni pomanjkljivosti preskusne metode STE, če se uporabi za opredelitev preskusnih kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči in hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP), visoka lažno negativna deleža za (i) zelo hlapne snovi s parnim tlakom nad 6 kPa ter (ii) trdne kemikalije (snovi in zmesi), ki niso površinsko aktivne snovi, in zmesi, ki jih sestavljajo samo površinsko aktivne snovi. Take kemikalije so izključene iz področja uporabe preskusne metode STE (7).
8. Poleg kemikalij, navedenih v odstavkih 6 in 7, podatkovni niz, ustvarjen s preskusno metodo STE, vsebuje tudi interne podatke o 40 zmesih, ki so v primerjavi z Dražnim preskusom draženja oči *in vivo* pokazali 88-odstotno točnost (35/40), 50-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (5/10) in 0-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (0/30) za napovedovanje zmesi, ki jih ni treba razvrstiti glede na sistema za razvrščanje po GHS ZN/uredbi CLP (9). Preskusna metoda STE se torej lahko uporabi za opredelitev zmesi kot zmesi brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP z uporabo pristopa od spodaj navzgor, razen za trdne zmesi, ki jih ne sestavljajo samo površinsko aktivne snovi, kot razširitev njene omejitve na trdne snovi. Poleg tega je treba zmesi, ki vsebujejo snovi s parnim tlakom nad 6 kPa, ocenjevati pazljivo, da se preprečijo morebitne razvrstitve v prenizko kategorijo, in jih utemeljiti za vsak primer posebej.
9. Preskusna metoda STE se ne more uporabiti za opredelitev preskusnih kemikalij kot kemikalij kategorije 2 po GHS ZN/uredbi CLP, kategorije 2A po GHS ZN (draženje oči) ali 2B (blažje draženje oči), saj je precejšnje število kemikalij kategorije 1 po GHS ZN/uredbi CLP razvrščenih v prenizko kategorijo, in sicer v kategorijo 2, 2A ali 2B, precejšnje število kemikalij brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP pa je razvrščenih previsoko, in sicer v kategorijo 2, 2A ali 2B (7). Zato je morda potrebno nadaljnje preskušanje z drugo ustrezno metodo.

10. Preskusna metoda STE je primerna za preskusne kemikalije, ki se raztopijo ali vsaj 5 minut enakomerno suspendirajo v fiziološki raztopini, 5-odstotnem dimetil sulfoksidu (DMSO) v fiziološki raztopini ali mineralnem olju. Po drugi strani ni primerna za preskusne kemikalije, ki niso topne ali jih ni mogoče vsaj 5 minut enakomerno suspendirati v fiziološki raztopini, 5-odstotnem DMSO v fiziološki raztopini ali mineralnem olju. Uporaba mineralnega olja pri preskusni metodi STE je mogoča zaradi kratkotrajne izpostavljenosti. Zato je preskusna metoda STE primerna za napovedovanje potencialne nevarnosti v vodi netopnih preskusnih kemikalij (npr. dolgoverižnih maščobnih alkoholov ali ketonov) za oči, če se mešajo z vsaj enim od treh zgoraj predlaganih topil (4).
11. Pojem ‚preskusna kemikalija‘ se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša ⁽¹⁾, in ni povezan z uporabnostjo preskusne metode STE za preskušanje snovi in/ali zmesi.

NAČELO PRESKUSA

12. Preskusna metoda STE je preskus *in vitro* na podlagi citotoksičnosti, ki se izvede na konfluentnem monosloju celic roženice kunca Statens Seruminstitut (SIRC), kultiviranih na 96-jamični polikarbonski mikrotitrski plošči (4). Po petminutni izpostavljenosti preskusni kemikaliji se citotoksičnost kvantitativno izmeri kot relativna viabilnost celic SIRC z uporabo analize MTT (4). Zmanjšana viabilnost celic se lahko uporabi za napoved potencialnih škodljivih učinkov, ki povzročajo očesne poškodbe.
13. V skladu s poročili se 80 % raztopine, nakapane v oko kunca, izloči skozi mešiček veznice v treh do štirih minutah, medtem ko se več kot 80 % raztopine, nakapane v človeško oko, izloči v eni do dveh minutah (10). Preskusna metoda STE se poskuša približati tem časom izpostavljenosti in uporablja citotoksičnost kot končno točko za oceno poškodovanosti celic SIRC po petminutni izpostavljenosti preskusni kemikaliji.

DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

14. Pred redno uporabo preskusne metode STE, opisane v tej preskusni metodi, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da pravilno razvrstijo 11 snovi, priporočenih v preglednici 1. Te snovi so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri hudih poškodbah oči ali draženju oči, temeljijo pa na rezultatih *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (TG 405) in sistemu za razvrščanje po GHS ZN/uredbi CLP (1). Druga merila za izbiro so vključevala razpoložljivost snovi na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro*, pridobljenih s preskusno metodo STE (3). V primerih, ko snov s seznama ni na voljo ali ko je to utemeljeno, se lahko uporabi druga snov, za katero so na voljo ustrezni referenčni podatki *in vivo* in *in vitro*, če se uporabijo enaka merila, kot so opisana tukaj.

Preglednica 1

Seznam snovi za preverjanje usposobljenosti

Snov	Št. CAS	Kemijski razred ⁽¹⁾	Agregatno stanje	Kat. <i>in vivo</i> po GHS ZN/uredbi CLP ⁽²⁾	Topilo pri preskusu STE	Kat. STE po GHS ZN/uredbi CLP
Benzalkonijev klorid (10 %, vodni)	8001-54-5	onijska spojina	tekoče	kategorija 1	fiziološka raztopina	kategorija 1

⁽¹⁾ Junija 2013 je bil na skupnem zasedanju sprejet dogovor, da bi bilo zdaj treba v novih in posodobljenih preskusnih metodah pojem ‚preskusna kemikalija‘, ki opisuje, kaj se preskuša, uporabljati dosledneje, kjer je to mogoče.

Snov	Št. CAS	Kemijski razred ⁽¹⁾	Agregatno stanje	Kat. in vivo po GHS ZN/uredbi CLP ⁽²⁾	Topilo pri preskusu STE	Kat. STE po GHS ZN/uredbi CLP
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	eter	tekoče	kategorija 1	fiziološka raztopina	kategorija 1
Kislo rdeče 92	18472-87-2	heterociklična spojina; bromova spojina; klorova spojina;	trdno	kategorija 1	fiziološka raztopina	kategorija 1
Natrijev hidroksid	1310-73-2	baza; anorganska kemikalija	trdno	kategorija 1 ⁽³⁾	fiziološka raztopina	kategorija 1
Butirolakton	96-48-0	lakton; heterociklična spojina	tekoče	kategorija 2A (kategorija 2 po uredbi CLP)	fiziološka raztopina	napoved ni mogoča
1-oktanol	111-87-5	alkohol	tekoče	Kategorija 2A/B ⁽⁴⁾ (kategorija 2 po uredbi CLP)	mineralno olje	napoved ni mogoča
Ciklopentanol	96-41-3	alkohol; ogljikovodik, ciklični	tekoče	Kategorija 2A/B ⁽⁵⁾ (kategorija 2 po uredbi CLP)	fiziološka raztopina	napoved ni mogoča
2-etoksietil acetat	111-15-9	alkohol; eter	tekoče	brez kategorije	fiziološka raztopina	brez kategorije
Dodekan	112-40-3	ogljikovodik, aciklični	tekoče	brez kategorije	mineralno olje	brez kategorije
Metil izobutil keton	108-10-1	keton	tekoče	brez kategorije	mineralno olje	brez kategorije

Snov	Št. CAS	Kemijski razred ⁽¹⁾	Agregatno stanje	Kat. <i>in vivo</i> po GHS ZN/uredbi CLP ⁽²⁾	Topilo pri preskusu STE	Kat. STE po GHS ZN/uredbi CLP
1,1-dimetilgvanidin sulfat	598-65-2	amidin; žveplova spojina	trdno	brez kategorije	fiziološka raztopina	brez kategorije

⁽¹⁾ Kemijski razredi so bili dodeljeni na podlagi informacij iz prejšnjih objav centra NICEATM, če te niso bile na voljo, pa na podlagi sistema za razvrščanje MeSH[®] (National Library of Medicine Medical Subject Headings) (prek ChemIDplus[®] (National Library of Medicine), na voljo na <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) in strukturnih določitev, ki jih je opravil center NICEATM.

⁽²⁾ Na podlagi rezultatov *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (OECD TG 405) in z uporabo GHS ZN/uredbe CLP (1).

⁽³⁾ Razvrstitev v kategorijo 1 temelji na potencialu jedkosti za kožo, ki ga ima 100-odstotni natrijev hidroksid (v OECD TG 435 uvrščen na seznam kemikalij za preverjanje sposobnosti s potencialom jedkosti za kožo), in merilu za kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP (1).

⁽⁴⁾ Razvrstitev v kategorijo 2A ali 2B je odvisna od razlage merila za razlikovanje med obema kategorijama po GHS ZN, in sicer dve od šestih oziroma štiri od šestih živali, ki imajo sedmi dan učinke, zaradi katerih je treba kemikalijo razvrstiti v kategorijo 2A. Podatkovni niz *in vivo* je vključeval dve študiji s po tremi živalmi. V eni študiji sta dve od treh živali pokazali učinke sedmi dan, tako da je bila upravičena razvrstitev v kategorijo 2A (11), medtem ko so se v drugi študiji vse končne točke pri vseh treh živalih do sedmega dne popravile in so dosegle vrednost nič, zato je bila upravičena razvrstitev v kategorijo 2B (12).

⁽⁵⁾ Razvrstitev v kategorijo 2A ali 2B je odvisna od razlage merila za razlikovanje med obema kategorijama po GHS ZN, in sicer ena od treh oziroma dve od treh živali, ki imajo sedmi dan učinke, zaradi katerih je treba kemikalijo razvrstiti v kategorijo 2A. V študijo *in vivo* so bile vključene tri živali. Vse končne točke, razen motnjave roženice in rdečine veznice na eni živali, so se do sedmega dne ali prej popravile in so dosegle vrednost nič. Pri eni živali, ki si do sedmega dne ni popolnoma opomogla, je motnjava roženice (sedmi dan) dosegla vrednost 1 in rdečina veznice vrednost 1, popolnoma pa si je opomogla 14. dan (11). Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS).

POSTOPEK

Priprava celičnega monosloja

15. Za izvedbo preskusne metode STE je treba uporabiti celično linijo roženice kunca, SIRC. Priporočljivo je, da se celice SIRC pridobijo iz celične banke z dobrimi kvalifikacijami, kot je American Type Culture Collection CCL60.
16. Celice SIRC se gojijo pri 37 °C v navlaženi atmosferi s 5 % CO₂ v steklenički za gojenje celičnih kultur, ki vsebuje gojišče z Eagleovim minimalnim osnovnim gojiščem (MEM), dopolnjeno z 10-odstotnim fetusnim serumom goveda (FBS), 2 mM L-glutamina, 50–100 enotami/ml penicilina in 50–100 µg/ml streptomocina. Celice, ki v steklenički za gojenje postanejo konfluentne, je treba s celičnim strgalom ali brez njega ločiti z raztopino tripsin-etilendiamintetraacetne kisline. Celice se najprej namnožijo (npr. 2 do 3 pasaže) v steklenički za gojenje, nato pa uporabijo za rutinsko preskušanje, in sicer do največ 25 pasaž po odtajanju.
17. Celice, ki so na voljo za uporabo pri preskusu STE, se nato pripravijo z ustrezno gostoto in nasadijo na 96-jamične plošče. Priporočena gostota nasaditve celic je 6,0 × 10³ celic na jamico, če se celice uporabijo štiri dni po nasaditvi, ali 3,0 × 10³ celic na jamico, če se celice uporabijo pet dni po nasaditvi, pri čemer količina kulture znaša 200 µl. Celice, ki se uporabijo pri preskusu STE in so nasajene v gojišče z ustrezno gostoto, bodo ob preskušanju, tj. štiri ali pet dni po nasaditvi, dosegle več kot 80-odstotno konflueno.

Nanos preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi

18. Kot topilo za raztapljanje ali suspendiranje preskusnih kemikalij se najprej izbere fiziološka raztopina. Če se preskusna kemikalija izkaže za slabo topno ali je ni mogoče vsaj pet minut enakomerno raztopiti ali suspendirati v fiziološki raztopini, se kot druga izbira za topilo uporabi 5-odstotni DMSO (CAS#67-68-5) v fiziološki raztopini. Za preskusne kemikalije, ki jih ni mogoče enakomerno raztopiti ali vsaj pet minut suspendirati v fiziološki raztopini ali 5-odstotnem DMSO, se kot tretja izbira za topilo uporabi mineralno olje (CAS#8042-47-5).
19. Preskusne kemikalije se enakomerno raztopijo ali suspendirajo v izbranem topilu do koncentracije 5 mas. % in nadalje razredčijo z zaporednim 10-stopenjskim redčenjem do 0,5- in 0,05-odstotne koncentracije. Vsako preskusno kemikalijo je treba preskusiti pri 5- in 0,05-odstotni koncentraciji. Celice, gojene na 96-jamični plošči, se za pet minut pri sobni temperaturi izpostavijo 5- ali 0,05-odstotni koncentraciji raztopine (ali suspenzije) preskusne kemikalije, in sicer se uporabi 200 µl/jamico. Preskusne kemikalije (snovi iz ene sestavine, snovi z več sestavinami ali zmesi) se štejejo za nerazredčene snovi in se razredčijo ali suspendirajo v skladu z metodo ne glede na svojo čistost.
20. Na vsaki plošči se za vsako ponovitev kot kontrola z medijem uporabi gojišče, opisano v odstavku 16. Prav tako je treba celice na vsaki plošči za vsako ponovitev izpostaviti tudi vzorcem kontrole s topilom. Topila, navedena v odstavku 18, potrjeno nimajo škodljivih učinkov na viabilnost celic SIRC.
21. Pri preskusni metodi STE je treba kot pozitivno kontrolo na vsaki plošči za vsako ponovitev uporabiti 0,01-odstotni natrijev lavril sulfat (SLS) v fiziološki raztopini. Da se izračuna viabilnost celic v pozitivni kontroli, mora vsaka plošča za vsako ponovitev vključevati tudi kontrolo s topilom v fiziološki raztopini.
22. Za določitev izravnave optične gostote je potreben slepi vzorec, ki ga je treba izvesti na jamicah, ki vsebujejo samo fosfatni pufer s soljo, ne pa tudi kalcija in magnezija (PBS-) ali celic.
23. Vsak vzorec (preskusna kemikalija pri 5- in 0,05-odstotni koncentraciji, kontrola z medijem, kontrola s topilom in pozitivna kontrola) je treba preskusiti v treh ponovitvah, tako da se celice za pet minut pri sobni temperaturi izpostavijo 200 µl ustrezne preskusne ali kontrolne kemikalije.
24. Primerjalne snovi so primerne za ocenjevanje potenciala za draženje oči, ki ga imajo neznane kemikalije določenega kemijskega ali proizvodnega razreda, ali za ocenjevanje relativnega potenciala snovi za draženje oči v določenem razponu dražilnih učinkov.

Meritev viabilnosti celic

25. Po izpostavitvi se celice dvakrat sperejo z 200 µl PBS in doda se 200 µl raztopine MTT (0,5 mg MTT/ml gojišča). Po dvournem reakcijskem času v inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂) se raztopina MTT odlije, formazan MTT se 60 minut v temi pri sobni temperaturi ekstrahira z dodajanjem 200 µl 0,04 N klorovodikove kisline-izopropanola, absorbanca raztopine formazana MTT pa se izmeri pri 570 nm z uporabo čitalca plošče. Interferenca preskusnih kemikalij z analizo MTT (z barvili ali snovmi, ki neposredno zmanjšujejo MTT) se pojavi samo, če v preskusnem sistemu po spiranju po izpostavitvi ostane znatna količina preskusne kemikalije, kar velja za tridimenzionalno rekonstruirano človeško roženico ali tkiva rekonstruirane človeške pokožnice, ni pa pomembno za dvodimenzionalne celične kulture, ki se uporabljajo pri preskusni metodi STE.

Razlaga rezultatov in napovedni model

26. Vrednosti optične gostote (OD), pridobljene za vsako preskusno kemikalijo, se nato uporabijo za izračun viabilnosti celic glede na kontrolo s topilom, katere viabilnost je 100-odstotna. Relativna viabilnost celic je izražena kot delež, dobi pa se tako, da se optična gostota preskusne kemikalije deli z optično gostoto kontrole s topilom, potem ko se od obeh vrednosti odšteje optična gostota slepega vzorca.

$$\text{viabilnost celic(\%)} = \frac{(OD_{570} \text{ preskusne kemikalije}) - (OD_{570} \text{ slepega vzorca})}{(OD_{570} \text{ kontrole s topilom}) - (OD_{570} \text{ slepega vzorca})} \times 100$$

Podobno je kot delež izražena relativna viabilnost celic vsake kontrole s topilom, dobi pa se tako, da se optična gostota vsake kontrole s topilom deli z optično gostoto kontrole z medijem, potem ko se od obeh vrednosti odšteje optična gostota slepega vzorca.

27. Izvesti je treba tri neodvisne ponovitve, pri čemer vsaka vsebuje tri jamice s ponovljenimi vzorci (tj. $n = 9$). Za izračun aritmetične sredine relativne viabilnosti celic se uporabi aritmetična sredina vseh treh jamic za vsako preskusno kemikalijo in kontrolo s topilom pri vsaki neodvisni ponovitvi. Končna aritmetična sredina viabilnosti celic se izračuna iz treh neodvisnih ponovitev.
28. Mejne vrednosti viabilnosti celic za opredelitev preskusnih kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP), in preskusnih kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP), so navedene v nadaljevanju.

Preglednica 2

Napovedni model preskusne metode STE

Viabilnost celic		Razvrstitev po GHS ZN/uredbi CLP	Uporaba
Pri 5 %	Pri 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	brez kategorije	snovi in zmesi, razen: (i) zelo hlapnih snovi s parnim pritiskom nad 6 kPa ⁽¹⁾ in (ii) trdnih kemikalij (snovi in zmesi), ki niso površinsko aktivne snovi in zmesi, ki jih sestavljajo samo površinsko aktivne snovi
≤ 70 %	> 70 %	napoved ni mogoča	ni relevantno
≤ 70 %	≤ 70 %	kategorija 1	snovi in zmesi ⁽²⁾

⁽¹⁾ Zmesi, ki vsebujejo snovi s parnim tlakom nad 6 kPa, je treba ocenjevati pazljivo, da se preprečijo morebitne prenizke razvrstitve, in jih utemeljiti za vsak primer posebej.

⁽²⁾ Na podlagi rezultatov, dobljenih v glavnem za snovi iz ene sestavine, čeprav obstaja tudi omejena količina podatkov o preskušanju zmesi. Preskusna metoda je kljub temu tehnično ustrezna tudi za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi. Preden se ta preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki predpisi niso potrebni.

Merila za sprejemljivost

29. Rezultati preskusa se štejejo za sprejemljive, če so izpolnjena vsa merila, navedena v nadaljevanju.

- a) Ko se odšteje optična gostota slepega vzorca, mora biti optična gostota kontrole z medijem (izpostavljenega gojišču) 0,3 ali višja.

- b) Viabilnost kontrole s topilom mora biti 80-odstotna ali višja glede na kontrolo z medijem. Če se pri vsaki ponovitvi uporabi več kontrol s topilom, je več kot 80-odstotna viabilnost celic pri vsaki od teh kontrol pogoj, da se kemikalije, preskušene s temi topili, štejejo za ustrezne.
- c) Viabilnost celic, dobljena s pozitivno kontrolo (0,01-odstotni SLS), mora biti znotraj dveh standardnih odklonov srednje vrednosti iz preteklih preskusov. Zgornjo in spodnjo mejo sprejemljivosti za pozitivno kontrolo je treba pogosto posodabljeti, tj. vsake tri mesece ali vedno, kadar preskus izvajajo laboratoriji, ki preskuse izvajajo redko (tj. manj kot enkrat mesečno). Kadar laboratorij ne izvede zadostnega števila poskusov za določitev statistično zanesljive porazdelitve pozitivnih kontrol, je sprejemljivo uporabiti zgornjo in spodnjo mejo sprejemljivosti, ki ju je določil razvijalec metode, tj. med 21,1 % in 62,3 % glede na podatke laboratorija iz preteklih preskusov, medtem ko se notranja porazdelitev razvije med prvimi rutinskimi preskusi.
- d) Standardni odklon končne viabilnosti celic, ki izhaja iz treh neodvisnih ponovitev, mora znašati manj kot 15 % pri 5- in 0,05-odstotni koncentraciji preskusne kemikalije.

Če eno ali več teh meril ni izpolnjenih, je treba rezultate zavreči in izvesti nove tri neodvisne ponovitve.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

30. Navesti je treba podatke za vsako posamezno jamico (npr. vrednosti viabilnosti celic) pri vsaki ponovitvi ter skupno srednjo vrednost, standardni odklon in razvrstitev.

Poročilo o preskusu

31. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija in kontrolne snovi

- Snov iz ene sestavine: kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, registrska številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- snov z več sestavinami, UVCB in zmesi: čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;
- agregatno stanje, hlapnost, vrednost pH, LogP, molekulska masa, kemijski razred in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, če so na voljo;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo.

Pogoji in postopki preskusne metode

- Ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;
- opis uporabljene preskusne metode;

- uporabljena celična linija, njen izvor, številka pasaže in konfluenca celic, uporabljenih za preskušanje;
- podrobnosti o uporabljenem preskusnem postopku;
- uporabljeno število ponovitev in ponovljenih vzorcev;
- uporabljene koncentracije preskusnih kemikalij (če se razlikujejo od priporočenih);
- utemeljitev izbire topila za vsako preskusno kemikalijo;
- trajanje izpostavljenosti preskusni kemikaliji (če se razlikuje od priporočenega);
- opis morebitnih prilagoditev preskusnega postopka;
- opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitev;
- sklic na srednjo vrednost pozitivne kontrole iz preteklih preskusov in standardni odklon;
- dokaz usposobljenosti laboratorija v zvezi z izvedbo preskusne metode (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti) ali za prikaz ponovljivosti izvedbe preskusne metode v daljšem časovnem obdobju.

Rezultati

- Za vsako preskusno kemikalijo in kontrolno snov ter vsako preskušeno koncentracijo je treba v preglednici navesti posamezne vrednosti optične gostote na jamico s ponovljenimi vzorci, aritmetično sredino vrednosti optične gostote za vsako neodvisno ponovitev, delež viabilnosti celic za vsako neodvisno ponovitev ter končno aritmetično sredino deleža viabilnosti celic in standardnega odklona v treh ponovitvah;
- rezultate za kontrolo z medijem, kontrolo s topilom in pozitivno kontrolo, ki dokazujejo ustrezna merila za sprejemljivost študije;
- opis drugih opaženih učinkov;
- splošno izpeljano razvrstitev z navedbo uporabljenega napovednega modela/meril za odločitev.

Razprava o rezultatih

Sklepne ugotovitve

VIRI

- (1) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). Peta revidirana izdaja. New York in Ženeva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) Scott, L., *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1–9.

- (3) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- (4) Takahashi, Y., *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22, 760–770.
- (5) Sakaguchi, H., *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25, 796–809.
- (6) Kojima, H., *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, str. 1855–1869.
- (7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Na voljo na: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) Poglavje B.5 te priloge: Akutno draženje oči/jedkost za oči.
- (9) Saito, K., *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
- (10) Mikkelsen, T. J., Chrai, S. S., in Robinson, J. R. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.* 1648–1653.
- (11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (št. 48. (2)), Bruselj, Belgija.
- (12) Gautheron, P., *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 442–449.
- (13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 263). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

Dodatek

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz skladnost se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravih rezultatov preskusne metode (13).

Primerjalna snov: snov, ki se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno kemikalijo. Primerjalna snov mora imeti naslednje lastnosti: (i) ima trajen in zanesljiv vir; (ii) je strukturno in funkcijsko podobna kemikalijam iz preskušane razrede; (iii) ima znane fizikalne/kemijske lastnosti; (iv) ima spremne podatke o znanih učinkih in (v) ima znano moč v razponu želenega odziva.

Pristop od spodaj navzgor: stopenjski pristop, ki se uporablja za preskusno kemikalijo, za katero se domneva, da ne potrebuje razvrstitve glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki ne potrebujejo razvrstitve (negativni rezultat), nato pa druge kemikalije (pozitivni rezultat).

Kemikalija: snov ali zmes.

Draženje oči: je povzročitev sprememb v očesu po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki so v celoti popravljive v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za „popravljive učinke na oči“ in kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP.

Delež lažno negativnih rezultatov: delež vseh pozitivnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot negativne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Delež lažno pozitivnih rezultatov: delež vseh negativnih kemikalij, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot pozitivne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Nevarnost: neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki lahko ob izpostavljenosti temu sredstvu povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

Kontrola z medijem: netretiran ponovljen vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema. Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, ali drugimi kontrolnimi vzorci, da se ugotovi, ali topilo reagira s preskusnim sistemom.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

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

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

OD: optična gostota.

Pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere se s preskusom pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (10).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (13).

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (10).

Huda poškodba oči: povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljiva v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za „nepopravljive učinke na oči“ in kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP.

Kontrola s topilom/vehiklom: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema, vključno s topilom ali vehiklom, ki se obdela s kontrolnimi vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se določi izhodiščni odziv za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno v istem topilu ali vehiklu. Pri preskušanju s sočasno kontrolo z medijem ta vzorec tudi pokaže, ali topilo ali vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (13).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez katerega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Površinsko aktivna snov: kemikalija, kot je detergent, ki lahko zmanjša površinsko napetost tekočine in tako omogoči, da se speni ali prodre v trdne snovi; znana je tudi kot omakalno sredstvo.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Večstopenjska strategija preskušanja: stopenjsko preskušanje, pri katerem se v posebnem vrstnem redu pregledajo vsi obstoječi podatki o preskusni kemikaliji, pri čemer se na vsaki stopnji uporabi postopek, ki temelji na zanesljivosti dokazov, da se določi, ali je pred nadaljevanjem na naslednji stopnji na voljo dovolj podatkov za odločitev o razvrstitvi kemikalije glede na nevarnost, ki jo povzroča. Če se za preskusno kemikalijo na podlagi razpoložljivih podatkov lahko določi potencial za draženje, dodatno preskušanje ni potrebno. Če preskusni kemikaliji na podlagi razpoložljivih podatkov ni mogoče določiti potenciala za draženje, se izvede postopno zaporedno testiranje na živalih, dokler kemikalije ni mogoče jasno razvrstiti.

Pristop od zgoraj navzdol: stopenjski pristop, ki se uporablja za preskusno kemikalijo, za katero se domneva, da povzroča hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki jih je treba razvrstiti (pozitivni rezultat), nato pa še druge kemikalije (negativni rezultat).

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

Kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP: glej „Huda poškodba oči“.

Kategorija 2 po GHS ZN/uredbi CLP: glej „Draženje oči“.

Brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP: kemikalije, ki niso razvrščene v kategorijo 1 ali 2 po GHS ZN/uredbi CLP (ali kategorijo 2A ali 2B po GHS ZN).

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

B.69 PRESKUSNA METODA REKONSTRUIRANEGA EPITELIJA, PODOBNEGA ČLOVEŠKEMU ROŽENIČNEMU (RhCE), ZA OPREDELITEV KEMIKALIJ, KI JIH NI TREBA RAZVRSTITI IN OZNAČITI V ZVEZI Z DRAŽENJEM OČI ALI HUDIMI POŠKODBAMI OČI

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 492 (2017). *Huda poškodba oči* pomeni povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljiva v 21 dneh po nanosu, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) (1). Prav tako v skladu z GHS ZN in uredbo CLP *draženje oči* pomeni povzročitev sprememb v očesu po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki so v celoti popravljive v 21 dneh po nanosu. Preskusne kemikalije, ki povzročajo hude poškodbe oči, se razvrstijo v kategorijo 1 po GHS ZN in uredbi CLP, tiste, ki povzročajo draženje oči, pa v kategorijo 2 po GHS ZN in uredbi CLP. Preskusne kemikalije, ki niso razvrščene glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, so opredeljene kot kemikalije, ki ne izpolnjujejo meril za razvrstitev v kategorijo 1 ali 2 (2A ali 2B) po GHS ZN in uredbi CLP, kar pomeni, da se nanje sklicuje kot na kemikalije brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP.
2. Huda poškodba oči/draženje oči se je običajno ocenjevala z uporabo laboratorijskih živali (TM B.5 (2)). Izbiro najustreznejše preskusne metode in uporabo te preskusne metode je treba obravnavati v okviru smernice OECD za celostne pristope k testiranju in ocenjevanju (IATA) v zvezi s hudimi poškodbami oči in draženjem oči (39).
3. Ta preskusna metoda opisuje postopek *in vitro*, ki omogoča opredelitev kemikalij (snovi in zmesi), ki jih ni treba razvrstiti in označiti v zvezi z draženjem oči ali hudimi poškodbami oči v skladu z GHS ZN in uredbo CLP. Pri njej se uporablja rekonstruiran epitelij, podoben človeškemu roženičnemu (RhCE), ki ima zelo podobne histološke, morfološke, biokemijske in fiziološke značilnosti kot epitelij človeške roženice. Da bi se obravnavala končna točka hude poškodbe oči/draženje oči z vidika zdravja ljudi, so bile validirane, obravnavane kot znanstveno veljavne in sprejete še štiri druge preskusne metode *in vitro*, in sicer preskusne metode B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) in B.68 (6).
4. V to preskusno metodo sta vključena dva validirana, na trgu dostopna modela rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu. Validacijske študije za oceno draženja oči/hudih poškodb oči so bile izvedene (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) z uporabo preskusov EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) in SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Pri vsakem od teh preskusov se kot preskusni sistem uporabijo na trgu dostopne konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, v nadaljevanju pa sta navedena kot validirani referenčni metodi – VRM 1 oziroma VRM2. Na podlagi teh validacijskih študij in njegune neodvisnega medsebojnega strokovnega pregleda (9) (12) je bilo ugotovljeno, da se lahko s preskusoma EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT pravilno opredelijo kemikalije (tako snovi kot zmesi), ki jih ni treba razvrstiti in označiti v zvezi z draženjem oči ali hudimi poškodbami oči v skladu z GHS ZN, preskusa pa sta bila v ta namen priporočena kot znanstveno veljavna (13).
5. Zdaj na splošno velja, da Draizovega preskusa draženja oči *in vivo* v bližnji prihodnosti ne bo mogoče v celoti nadomestiti z eno samo preskusno metodo *in vitro* (2) (14), da bi se predvidel celoten razpon odzivov na hude poškodbe oči/ draženje oči za različne kemijske razrede. Draizov preskus draženja oči pa bi morda lahko v celoti nadomestile strateške kombinacije več alternativnih preskusnih metod v okviru (večstopenjskih) strategij preskušanja, kot je pristop od spodaj navzgor/od zgoraj navzdol (15). Pristop od spodaj navzgor (15) je treba uporabiti takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da kemikalija ne bo povzročila tolikšnega draženja oči, da bi jo bilo treba razvrstiti, pristop od zgoraj navzdol (15) pa takrat, ko se na podlagi obstoječih informacij pričakuje, da bo kemikalija povzročila hudo poškodbo oči. Preskusa EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT se priporočata za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči v skladu z GHS ZN/uredbo CLP (brez kategorije) brez nadaljnega preskušanja, v okviru strategije preskušanja, kot je pristop od spodaj navzgor/od zgoraj navzdol, ki ga Scott *et al.* na primer priporočajo kot prvi korak pri pristopu od spodaj navzgor

(1) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

ali enega od zadnjih korakov pri pristopu od zgoraj navzdol (15). Vendar preskusa EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT nista namenjena razlikovanju med kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP (huda poškodba oči) in kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP (draženje oči). To razlikovanje bo treba obravnavati z drugo stopnjo preskusne strategije (15). Preskusna kemikalija, za katero se s preskusom EpiOcular™ EIT ali SkinEthic™ HCE EIT ugotovi, da jo je treba razvrstiti glede na draženje oči/hude poškodbe oči, torej zahteva dodatno preskušanje (*in vitro* in/ali *in vivo*), da se sprejme dokončen sklep (brez kategorije, kategorija 1 ali kategorija 2 po GHS ZN/uredbi CLP), na primer z uporabo preskusne metode B.47, B.48, B.61 ali B.68.

6. V tej preskusni metodi je opisan postopek za oceno potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči glede na njeno zmožnost, da v konstrukciji tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, povzroči citotoksičnost, kot je izmerjena z analizo MTT (16) (glej odstavek 21). Viabilnost tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, po izpostavitvi preskusni kemikaliji se določi glede na tkiva, tretirana z negativno kontrolno snovjo (delež viabilnosti), nato pa se uporabi za napoved potencialne nevarnosti preskusne kemikalije za oči.
7. Na voljo so standardi izvajanja (17), da se olajša validacija novih ali prilagojenih *in vitro* preskusov na podlagi rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, ki so podobni preskusoma EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT, v skladu z načeli iz Smernice OECD 34 (18), in omogoči pravočasna sprememba Smernice OECD za preskušanje 492 za njuno vključitev. Medsebojno priznavanje podatkov v skladu s sporazumom OECD bo zagotovljeno le za preskuse, validirane v skladu s standardi izvajanja, če je te preskuse pregledala OECD in jih vključila v ustrezno smernico za preskušanje.

OPREDELITVE POJMOV

8. Opredelitve so navedene v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

9. Ta preskusna metoda temelji na tridimenzionalnih konstrukcijah tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu (RhCE), ki so dostopne na trgu in se proizvajajo bodisi iz primarnih keratinocitov človeške pokožnice (tj. EpiOcular™ OCL-200) bodisi iz nesmrtnih človeških epitelialnih celic roženice (tj. SkinEthic™ HCE/S). Konstrukciji tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, EpiOcular™ OCL-200 in SkinEthic™ HCE/S sta podobni tridimenzionalni strukturi roženičnega epitelijskega *in vivo* in se proizvajata iz celic preiskovane vrste (19) (20). Poleg tega se s preskusoma neposredno meri citotoksičnost, ki je posledica prehajanja kemikalije skozi roženico ter nastanka poškodb celic in tkiva; od citotoksičnega odziva je nato odvisen splošni rezultat hude poškodbe oči/draženja oči *in vivo*. Poškodbe celic lahko nastanejo zaradi različnih načinov delovanja (glej odstavek 20), vendar ima citotoksičnost pomembno, če ne glavno mehanistično vlogo pri določanju skupnega odziva na kemikalijo s hudo poškodbo oči/draženjem oči, ki se *in vivo* kaže predvsem z motnjavo roženice, vnetjem šarenice, rdečino veznice in/ali hemozo veznice, ne glede na fizikalno-kemijske procese, ki povzročajo poškodbo tkiva.
10. V validacijski študiji, na kateri temelji ta preskusna metoda, je bil preskušen širok nabor kemikalij, ki zajemajo najrazličnejše kemijske vrste, kemijske razrede, molekulske mase, LogP, kemijske strukture itd. Validacijska zbirka podatkov o preskusu EpiOcular™ EIT je vsebovala skupaj 113 kemikalij, ki zajemajo 95 različnih organskih funkcionalnih skupin glede na analizo z orodjem OECD QSAR (8). Večino teh kemikalij so predstavljale snovi iz ene sestavine, vendar je bilo v študijo vključenih tudi več snovi z več sestavinami (vključno s tremi homopolimeri, petimi kopolimeri in desetimi kvazipolimeri). Glede na agregatno stanje in kategorije po GHS ZN/uredbi CLP je bilo 113 preskušanih kemikalij razvrščenih tako: 13 tekočih snovi kategorije 1, 15 trdnih snovi kategorije 1, 6 tekočih snovi kategorije 2A, 10 trdnih snovi kategorije 2A, 7 tekočih snovi kategorije 2B, 7 trdnih snovi kategorije 2B, 27 tekočih snovi brez kategorije in 28 trdnih snovi brez kategorije (8). Validacijska zbirka podatkov o preskusu SkinEthic™ HCE EIT je vsebovala skupaj 200 kemikalij, ki zajemajo 165 različnih organskih funkcionalnih skupin (8) (10) (11). Večino teh kemikalij so predstavljale snovi iz ene sestavine, vendar je bilo v študijo vključenih tudi več snovi z več sestavinami (vključno z 10 polimeri). Glede na agregatno stanje in kategorije po GHS ZN/uredbi CLP je bilo 200 preskušanih kemikalij razvrščenih tako: 27 tekočih snovi kategorije 1, 24 trdnih snovi kategorije 1, 19 tekočih snovi kategorije 2A, 10 trdnih snovi kategorije 2A, 9 tekočih snovi kategorije 2B, 8 trdnih snovi kategorije 2B, 50 tekočih snovi brez kategorije in 53 trdnih snovi brez kategorije (10) (11).

11. Ta preskusna metoda se uporablja za snovi in zmesi ter trdne snovi, tekoče snovi, poltrdne snovi in voske. Tekoče snovi so lahko vodne raztopine ali ne, trdne snovi so lahko topne ali netopne v vodi. Če je mogoče, je treba trdne snovi pred nanosom zmleti v fin prah; druga predhodna obdelava vzorca ni potrebna. Plini in aerosoli v validacijski študiji niso bili ocenjeni. Čeprav se lahko preskusijo z uporabo tehnologije rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, veljavna preskusna metoda ne dovoljuje preskušanja plinov in aerosolov.
12. Preskusne kemikalije, ki absorbirajo svetlobo v enakem razponu kot formazan MTT (naravno ali po tretiranju), in preskusne kemikalije, ki lahko povzročijo neposredno redukcijo vitalnega barvila MTT (v formazan MTT), lahko vplivajo na meritve viabilnosti tkiva, zato je treba za popravke uporabiti prilagojene kontrole. Vrsta prilagojenih kontrol, ki so lahko potrebne, je odvisna od vrste interference, ki jo povzroča preskusna kemikalija, in postopka za kvantifikacijo formazana MTT (glej odstavke 36–42).
13. Rezultati, dobljeni s predvalidacijsko (21) (22) in popolno validacijsko (8) (10) (11) študijo, dokazujejo, da se lahko preskusa EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT preneseta v laboratorije, za katere se šteje, da nimajo izkušenj z izvajanjem preskusov, ter da ju je mogoče obnoviti znotraj laboratorija in med laboratoriji. Na podlagi teh študij je stopnja obnovljivosti v smislu ujemanja napovedi, ki ga je mogoče pričakovati pri preskusu EpiOcular™ EIT glede na podatke o 113 kemikalijah, v enem laboratoriju 95-odstotna, v več laboratorijih pa 93-odstotna. Stopnja obnovljivosti v smislu ujemanja napovedi, ki ga je mogoče pričakovati pri preskusu SkinEthic™ HCE EIT glede na podatke o 120 kemikalijah, je v enem laboratoriju 92-odstotna, v več laboratorijih pa 95-odstotna.
14. Preskus EpiOcular™ EIT se lahko uporabi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči v skladu s sistemom za razvrščanje po GHS ZN in uredbi CLP. Glede na podatke, pridobljene v validacijski študiji (8), ima preskus EpiOcular™ EIT 80-odstotno splošno točnost (na podlagi 112 kemikalij), 96-odstotno občutljivost (na podlagi 57 kemikalij), 4-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (na podlagi 57 kemikalij), 63-odstotno specifičnost (na podlagi 55 kemikalij) in 37-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (na podlagi 55 kemikalij) v primerjavi s podatki *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5) (2) (14), razvrščenimi v skladu s sistemom za razvrščanje po GHS ZN in uredbi CLP. Študija, v kateri je bilo s preskusom EpiOcular™ EIT preskušanih 97 tekočih agrokemijskih pripravkov, je dokazala podobno učinkovitost preskusne metode za to vrsto zmesi, kot je bila dobljena v validacijski študiji (23). 97 pripravkov je bilo razvrščenih tako: 21 kategorije 1, 19 kategorije 2A, 14 kategorije 2B in 43 brez kategorije, razvrščenih v skladu s sistemom za razvrščanje po GHS ZN na podlagi podatkov *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5) (2) (14). Dobljeni so bili 82-odstotna splošna točnost (na podlagi 97 pripravkov), 91-odstotna občutljivost (na podlagi 54 pripravkov), 9-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (na podlagi 54 pripravkov), 72-odstotna specifičnost (na podlagi 43 pripravkov) in 28-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (na podlagi 43 pripravkov) (23).
15. Preskus SkinEthic™ HCE EIT se lahko uporabi za opredelitev kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči v skladu s sistemom za razvrščanje po GHS ZN in uredbi CLP. Glede na podatke, pridobljene v validacijski študiji (10) (11), ima preskus SkinEthic™ HCE EIT 84-odstotno splošno točnost (na podlagi 200 kemikalij), 95-odstotno občutljivost (na podlagi 97 kemikalij), 5-odstotni delež lažno negativnih rezultatov (na podlagi 97 kemikalij), 72-odstotno specifičnost (na podlagi 103 kemikalij) in 28-odstotni delež lažno pozitivnih rezultatov (na podlagi 103 kemikalij) v primerjavi s podatki *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5) (2) (14), razvrščenimi v skladu s sistemom za razvrščanje po GHS ZN in uredbi CLP.
16. Deleža lažno negativnih rezultatov, dobljena z obema preskusoma rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, za snovi ali zmesi spadata v okvir 12-odstotne splošne verjetnosti, da bodo kemikalije z Draizovim preskusom draženja oči *in vivo* pri ponovljenih preskusih opredeljene kot kategorija 2 po GHS ZN in uredbi CLP ali

brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP; razlog za to je variabilnost znotraj preskusa, ki je neločljivo povezana z metodo (24). Deleža lažno pozitivnih rezultatov, dobljena z obema preskusnima metodama rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, za snovi ali zmesi, nista ključna v okviru te preskusne metode, saj je za vse preskusne kemikalije, ki povzročajo viabilnost tkiva, največ enako določenim mejnim vrednostim (glej odstavek 44), potrebno nadaljnje preskušanje z drugimi preskusnimi metodami *in vitro* ali – kot zadnja možnost pri kuncih –, odvisno od regulativnih zahtev, uporaba strategije zaporednega preskušanja s pristopom, ki temelji na zanesljivosti dokazov. Ti preskusni metodi se lahko uporabita za vse vrste kemikalij, pri čemer je treba negativen rezultat sprejeti, kot da ne razvršča kemikalije glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP). Pred uporabo preskusov EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT v okviru drugih sistemov za razvrščanje, ki niso sistemi po GHS ZN/uredbi CLP, se je treba posvetovati z ustreznimi regulativnimi organi.

17. Omejitev te preskusne metode je, da ne omogoča razlikovanja med draženjem oči/popravljivimi učinki na oči (kategorija 2) in hudo poškodbo oči/nepopravljivimi učinki na oči (kategorija 1), kot so opredeljeni z GHS ZN in uredbo CLP, niti med dražilnimi snovmi za oči (neobvezna kategorija 2A) in blagimi dražilnimi snovmi za oči (neobvezna kategorija 2B), kot so opredeljene z GHS ZN (1). Za te namene je potrebno nadaljnje preskušanje z drugimi preskusnimi metodami *in vitro*.
18. Pojem, preskusna kemikalija' se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša ⁽²⁾, in ni povezan z uporabnostjo preskusne metode rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, za preskušanje snovi in/ali zmesi.

NAČELO PRESKUSA

19. Preskusna kemikalija se lokalno nanese na vsaj dve tridimenzionalni konstrukciji tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, nato pa se po izpostavljenosti in inkubaciji dobi po tretiranju izmeri viabilnost tkiv. Tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, se rekonstruirajo iz primarnih keratinocitov človeške pokožnice ali nesmrtnih človeških epitelnih celic roženice, ki so se gojile več dni, tako da tvorijo razslojen, zelo diferenciran skvamozni epitelij, ki je morfološko podoben tistemu v človeški roženici. Konstrukcijo tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, pri preskusu EpiOcular™ sestavljajo vsaj tri vidne plasti celic in neporožena površina, katere struktura je podobna roženici *in vivo*. Konstrukcijo tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, pri preskusu SkinEthic™ HCE sestavljajo vsaj štiri vidne plasti celic, ki vključujejo stebričaste bazalne celice, prehodne krilaste celice in površinske skvamozne celice, podobne celicam normalnega človeškega roženičnega epitelija (20) (26).
20. S kemikalijo izzvane hude poškodbe oči/draženje oči, ki se *in vivo* kažejo predvsem z motnjavo roženice, vnetjem šarenice, rdečino veznice in/ali hemozo veznice, so rezultat kaskadnih reakcij, ki se začnejo s prodiranjem kemikalije skozi roženico in/ali veznico in nastankom poškodb celic. Poškodbe celic lahko nastanejo z različnimi načini delovanja, vključno z: lizo celične membrane (npr. s površinsko aktivnimi snovmi, organskimi topili); koagulacijo makromolekul (zlasti proteinov) (npr. s površinsko aktivnimi snovmi, organskimi topili, bazami in kislinami); umiljenjem lipidov (npr. z bazami) in alkilacijo ali drugimi kovalentnimi interakcijami z makromolekulami (npr. z belili, peroksidi in alkilatorji) (15) (27) (28). Vendar je bilo dokazano, da ima citotoksičnost pomembno, če ne glavno mehanistično vlogo pri določanju skupnega odziva na kemikalijo s hudo poškodbo oči/draženjem oči, ne glede na fizikalno-kemijske procese, ki povzročijo poškodbo tkiva (29) (30). Poleg tega je potencial kemikalije, da povzroči hude poškodbe oči/draženje oči, odvisen predvsem od obsega začetne poškodbe (31), ki je v korelaciji z obsegom celične smrti (29) ter obsegom poznejših odzivov in morebitnih rezultatov (32). Tako rahlo dražilne snovi običajno prizadenejo samo površinski epitelij roženice, blago in zmerno dražilne snovi poškodujejo predvsem epitelij in površinsko stromo, zelo dražilne snovi pa poškodujejo epitelij, globoko stromo in včasih roženični endotelij (30) (33). Merjenje viabilnosti konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, po lokalni izpostavitvi preskusni kemikaliji, da bi se opredelile kemikalije, ki jih ni treba razvrstiti glede na hude poškodbe oči/draženje oči (brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP), temelji na domnevi, da vse kemikalije, ki povzročajo hude poškodbe oči ali draženje oči, povzročajo citotoksičnost v roženičnem epiteliju in/ali veznici.

⁽²⁾ Junija 2013 je bil na skupnem zasedanju OECD sprejet dogovor, da bi bilo treba v novih in posodobljenih smernicah OECD za preskušanje pojem, preskusna kemikalija', ki opisuje, kaj se preskuša, zdaj dosledneje uporabljati, kjer je to mogoče.

21. Viabilnost tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, se običajno meri z encimsko pretvorbo vitalnega barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid; tiazolil modro tetrazol bromid; številka CAS 298-93-1), ki jo povzroči viabilne celice tkiva, v sol modrega formazana, količina katere se kvantitativno izmeri po ekstrakciji iz tkiv (16). Kemikalije, ki jih ni treba razvrstiti in označiti v skladu z GHS ZN/uredbo CLP (brez kategorije), so opredeljene kot kemikalije, ki ne zmanjšujejo viabilnosti tkiva pod določen prag (tj. viabilnost tkiva > 60 % pri preskusih EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EITL ⁽³⁾ ali > 50 % pri preskusu SkinEthic™ HCE EITS ⁽⁴⁾) (glej odstavek 44).

DOKAZOVANJE USPOSOBLJENOSTI

22. Pred redno uporabo preskusov rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, za regulativne namene morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da pravilno napovejo 15 kemikalij za preverjanje usposobljenosti, navedenih v preglednici 1. Te kemikalije so bile izbrane med kemikalijami, uporabljenimi v validacijskih študijah VRM (8) (10) (11). Kolikor je mogoče, so bile v izbor vključene kemikalije, ki: (i) zajemajo različna agregatna stanja; (ii) zajemajo celoten razpon odzivov *in vivo* s hudimi poškodbami oči/draženjem oči na podlagi visokokakovostnih rezultatov, dobljenih v referenčnem *in vivo* preskusu draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5) (2) (14), ter sistema za razvrščanje po GHS ZN (tj. kategorije 1, 2A, 2B ali brez kategorije) (1) in sistema za razvrščanje po uredbi CLP (tj. kategoriji 1 in 2 ali brez kategorije); (iii) zajemajo različne dejavnike razvrščanja *in vivo* (24) (25); (iv) predstavljajo kemijske razrede, uporabljene v validacijski študiji (8) (10) (11); (v) dobro in široko predstavljajo organske funkcionalne skupine (8) (10) (11); (vi) imajo dobro opredeljene kemijske strukture (8) (10) (11); (vii) so obarvane in/ali neposredno zmanjšujejo MTT; (viii) so povzročile obnovljive rezultate pri preskusnih metodah rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, med njihovo validacijo; (ix) so bile pravilno napovedane s preskusnimi metodami rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, med njihovimi validacijskimi študijami; (x) zajemajo celoten razpon odzivov *in vitro* na podlagi visokokakovostnih podatkov o preskusnih metodah rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu (od 0- do 100-odstotna viabilnost); (xi) so na voljo na trgu in (xii) se ne povezujejo s previsokimi stroški pridobivanja in/ali odstranjevanja. V primerih, ko kemikalija s seznama ni na voljo ali je ni mogoče uporabiti iz drugih utemeljenih razlogov, se lahko uporabi druga kemikalija, ki izpolnjuje zgoraj opisana merila, npr. spada med kemikalije, ki so bile uporabljene pri validaciji VRM. Taka odstopanja je treba sicer utemeljiti.

Preglednica 1

Seznam kemikalij za preverjanje usposobljenosti

Kemijsko ime	Št. CAS	Organska funkcionalna skupina ⁽¹⁾	Agregatno stanje	Viabilnost VRM1 (%) ⁽²⁾	Viabilnost VRM2 (%) ⁽³⁾	Napoved VRM	Snov, ki zmanjšuje MTT	Barvna interf.
--------------	---------	--	------------------	------------------------------------	------------------------------------	-------------	------------------------	----------------

Kategorija 1 *in vivo* ⁽⁴⁾

Metil tioglikolat	2365-48-2	karboksilna kislina, ester; tioalkohol	tekoče	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	napoved ni mogoča	da (močen)	ne
Hidroksietil akrilat	818-61-1	akrilat; alkohol	tekoče	7,5 ± 4,7 ⁽⁵⁾	1,6 ± 1,0	napoved ni mogoča	ne	ne
2,5-dimetil-2,5-heksandiol	110-03-2	alkohol	trdno	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	napoved ni mogoča	ne	ne
Natrijev oksalat	62-76-0	oksokarboksilna kislina	trdno	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	napoved ni mogoča	ne	ne

Kategorija 2A *in vivo* ⁽⁴⁾

2,4,11,13-tetraa-zatetradekan-diimidamid, N,N'-bis(4-klorofenil)-3,12-diimino-, di-D-glukonat (20 %, vodni) ⁽⁶⁾	18472-51-0	aromatski heterociklični halid; aril halid; dihidroksilna skupina; gvanidin	tekoče	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	napoved ni mogoča	ne	da (šibek)
--	------------	---	--------	-----------	-----------	-------------------	----	------------

⁽³⁾ EITL: EIT za tekočine v primeru preskusa SkinEthic™ HCE.

⁽⁴⁾ EITS: EIT za trdne snovi v primeru preskusa SkinEthic™ HCE.

Kemijsko ime	Št. CAS	Organska funkcionalna skupina ⁽¹⁾	Agre-gatno stanje	Viabilnost VRM1 (%) ⁽²⁾	Viabilnost VRM2 (%) ⁽³⁾	Napoved VRM	Snov, ki zmanjšuje MTT	Barvna interf.
Natrijev benzoat	532-32-1	aril; karboksilna kislina	trdno	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	napoved ni mogoča	ne	ne

Kategorija 2B in vivo ⁽⁴⁾

Dietil toluamid	134-62-3	benzamid	tekoče	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	napoved ni mogoča	ne	ne
2,2-dimetil-3-metilenbiklo [2.2.1] heptan	79-92-5	alkan, razvejan s terciarnim ogljikom; alken; bicikloheptan; premoščene karbociklične spojine; cikloalkan	trdno	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	napoved ni mogoča	ne	ne

Brez kategorije in vivo ⁽⁴⁾

1-etil-3-metilimidazoljev etilsulfat	342573-75-5	alkoksi; amonijeva sol; aril; imidazol; sulfat	tekoče	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	brez kat.	ne	ne
Dikaprilil eter	629-82-3	alkoksi; eter	tekoče	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	brez kat.	ne	ne
Piperonil butoksid	51-03-6	alkoksi; benzodioksol; benzil; eter	tekoče	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	brez kat.	ne	ne
Polietilen glikol (PEG-40) hidroge-nirano ricinusovo olje	61788-85-0	acilal; alkohol; alil; eter	viskozno	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	brez kat.	ne	ne
1-(4-klorofenil)-3-(3,4-diklorofenil) ureja	101-20-2	aromatski heterociklični halid; aril halid; derivati ureje	trdno	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	brez kat.	ne	ne
2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)-fenol)	103597-45-1	alkan, razvejan s kvarternim ogljikom; združena aromatska karbociklična spojina; združeni nasičeni heterocikli; prekurzorske kvinoidne spojine; terc-butil	trdno	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	brez kat.	ne	ne

Kemijsko ime	Št. CAS	Organska funkcionalna skupina ⁽¹⁾	Agre-gatno stanje	Viabilnost VRM1 (%) ⁽²⁾	Viabilnost VRM2 (%) ⁽³⁾	Napoved VRM	Snov, ki zmanjšuje MTT	Barvna interf.
Kalijev tetrafluoroborat	14075-53-7	anorganska sol	trdno	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Brez kat.	ne	ne

Kratice:

št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS); GHS ZN = globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (1); VRM1 = validirana referenčna metoda, EpiOcular™ EIT; VRM2 = validirana referenčna metoda, SkinEthic™ HCE EIT; barvna interf. = barvna interferenca pri meritvi standardne absorbance (optična gostota (OD)) formazana MTT.

⁽¹⁾ Organska funkcionalna skupina, dodeljena glede na ugnezdjeno analizo z orodjem OECD Toolbox 3.1 (8).

⁽²⁾ Na podlagi rezultatov, dobljenih s preskusom EpiOcular™ EIT, v validacijski študiji EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS) (8).

⁽³⁾ Na podlagi rezultatov, dobljenih s preskusom SkinEthic™ HCE EIT, v validacijski študiji (10) (11).

⁽⁴⁾ Na podlagi rezultatov *in vivo* preskusa draženja oči na kuncih (preskusna metoda B.5/OECD TG 405) (2) (14) in z uporabo GHS ZN.

⁽⁵⁾ Na podlagi rezultatov, dobljenih v CEFIC CONsortium, za študijo strategije preskušanja draženja oči *in vitro* (CON4EI).

⁽⁶⁾ Razvrstitev v kategorijo 2A ali 2B je odvisna od razlage merila za razlikovanje med obema kategorijama po GHS ZN, in sicer ena od treh oziroma dve od treh živali, ki imajo na sedmi dan učinke, zaradi katerih je treba kemikalijo razvrstiti v kategorijo 2A. V študijo *in vivo* so bile vključene tri živali. Vse končne točke, razen motnjave roženice na eni živali, so se do sedmega dne ali prej popravile in so dosegle vrednost nič. Pri eni živali, ki si do sedmega dne ni popolnoma opomogla, je motnjava roženice (na sedmi dan) dosegla vrednost 1, popolnoma pa si je opomogla deveti dan.

23. Razvrstitev v kategorijo 2A ali 2B je odvisna od razlage merila za razlikovanje med obema kategorijama po GHS ZN, in sicer ena od treh oziroma dve od treh živali, ki imajo na sedmi dan učinke, zaradi katerih je treba kemikalijo razvrstiti v kategorijo 2A. V študijo *in vivo* so bile vključene tri živali. Vse končne točke, razen motnjave roženice na eni živali, so se do sedmega dne ali prej popravile in so dosegle vrednost nič. Pri eni živali, ki si do sedmega dne ni popolnoma opomogla, je motnjava roženice (na sedmi dan) dosegla vrednost 1, popolnoma pa si je opomogla deveti dan. V okviru preskušanja usposobljenosti se priporoča, naj uporabniki po prejetju preverijo značilnosti pregrade tkiv, kakor to določa proizvajalec konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu (glej odstavke 25, 27 in 30). To je zlasti pomembno, če tkiva potujejo na dolge razdalje/dalj časa. Potem ko je preskus uspešno vzpostavljen ter je pridobljena in dokazana usposobljenost za njegovo uporabo, tako redno preverjanje ni več potrebno. Vendar se priporoča, da se ob redni uporabi preskusa v rednih časovnih razmikih še naprej ocenjujejo značilnosti pregrade.

POSTOPEK

24. Preskusa, ki sta zdaj zajeta s to preskusno metodo, sta znanstveno veljavna EpiOcular™ EIT in SkinEthic™ HCE EIT (9) (12) (13), imenovana validirana referenčna metoda (VRM1 oziroma VRM2). Na voljo so standardni delovni postopki za preskusne metode rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, ki jih je treba uporabljati pri izvajanju in uporabi preskusnih metod v laboratoriju (34) (35). V naslednjih odstavkih in Dodatku 2 so opisani glavni elementi in postopki preskusov rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu.

ELEMENTI PRESKUSNE METODE REKONSTRUIRANEGA EPITELIJA, PODOBNEGA ČLOVEŠKEMU ROŽENIČNEMU

Splošni pogoji

25. Za rekonstrukcijo tridimenzionalnega tkiva epitelijskega, podobnega roženičnemu, ki mora biti sestavljen iz postopno razslojenih, vendar ne poroženelih celic, je treba uporabiti ustrezne človeške celice. Konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, se pripravi v vstavkih s porozno sintetično membrano, skozi katero lahko hranila prehajajo do celic. V rekonstruiranem epiteliju, podobnem roženičnemu, mora biti več slojev živih, neporoženelih epiteljskih celic. Epitelna površina konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, mora biti v neposrednem stiku z zrakom, da se omogoči neposredna lokalna izpostavljenost preskusnim kemikalijam, podobno kot bi bil roženični epitelij izpostavljen *in vivo*. Konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, mora tvoriti dovolj močno funkcionalno pregrado za zaustavitev hitre penetracije citotoksičnih primerjalnih snovi, npr. Tritona X-100 ali natrijevega dodecil sulfata (SDS). Pregradna funkcija mora biti dokazana in se lahko oceni z določitvijo časa izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti tkiva za 50 % (ET₅₀) po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne snovi (npr. 100 µl Tritona X-100 s koncentracijo 0,3 vol. %), ali koncentracije, pri kateri se zaradi primerjalne snovi po določenem času izpostavljenosti viabilnost tkiv zmanjša za 50 % (IC₅₀) (npr. 30-minutno tretiranje s 50 µl SDS) (glej odstavek 30). Zadrževalne značilnosti konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, morajo preprečevati prehod preskusne kemikalije okoli robu viabilnega tkiva, kar bi lahko preprečilo učinkovitost modelov za raziskovanje v zvezi z izpostavljenostjo roženice. Človeške celice, uporabljene za pripravo konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, ne smejo biti okužene z bakterijami, virusi, mikoplazmo ali glivami. Sterilnost konstrukcije tkiva mora preveriti dobavitelj, da izključi okužbo z glivami ali bakterijami.

Pogoji za funkcionalnost

Viabilnost

26. Preskus, ki se uporablja za kvantifikacijo viabilnosti tkiva, je analiza MTT (16). Viabilne celice konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, reducirajo vitalno barvilo MTT v oborino modrega

formazana MTT, ki se nato ekstrahira iz tkiva z uporabo izopropanola (ali podobnega topila). Ekstrahirani formazan MTT se lahko kvantificira bodisi z uporabo meritve standardne absorbance (optična gostota (OD)) bodisi z uporabo postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC (36). Optična gostota (OD) izvlečka ekstrakcijskega topila mora biti dovolj majhna, tj. $OD < 0,1$. Uporabniki konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, morajo zagotoviti, da vsaka serija konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, izpolnjuje merila, določena za negativno kontrolo. Razponi sprejemljivosti za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli za validirani preskusni metodi so navedeni v preglednici 2. Uporabnik spektrofotometrije HPLC/UPLC mora razpone optične gostote pri negativni kontroli, navedene v preglednici 2, uporabiti kot merilo za sprejemljivost negativne kontrole. V poročilu o preskusu je treba evidentirati, da so tkiva, tretirana z negativno kontrolno snovjo, obstojna v kulturi (zagotoviti je treba podobne meritve viabilnosti tkiva) med celotnim trajanjem preskusnega obdobja izpostavljenosti. Podoben postopek mora proizvajalec tkiva uporabiti v okviru kontrole kakovosti ob sprostitvi serij tkiv, vendar se lahko v tem primeru uporabijo drugačna merila za sprejemljivost, kot so navedena v preglednici 2. Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli (v pogojih kontrole kakovosti preskusne metode) mora določiti razvijalec/dobavitelj konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu.

Preglednica 2

Razponi sprejemljivosti za vrednosti optične gostote pri negativni kontroli (za uporabnike preskusa)

Preskus	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (za protokol za tekoče snovi in protokol za trdne snovi)	$> 0,8$ ⁽¹⁾	$< 2,5$
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (za protokol za tekoče snovi in protokol za trdne snovi)	$> 1,0$	$\leq 2,5$

⁽¹⁾ Pri tej meji sprejemljivosti se upošteva možnost podaljšane dobe dobave/hrambe (npr. > 4 dni), ki dokazano ne vpliva na učinkovitost preskusne metode (37).

Pregradna funkcija

27. Konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, mora biti dovolj debela in trdna, da zaustavi hitro penetracijo citotoksičnih primerjalnih snovi, ocenjenih npr. z ET_{50} (Triton X-100) ali IC_{50} (SDS) (preglednica 3). Pregradno funkcijo vsake serije uporabljene konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, mora dokazati njen razvijalec/prodajalec ob dobavi tkiv končnemu uporabniku (glej odstavek 30).

Morfologija

28. Histološki pregled konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, mora dokazati strukturo epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu (vključno z vsaj tremi plastmi živih epiteljskih celic in neporoženo površino). Za VRM je ustrezno morfologijo določil razvijalec/dobavitelj, zato je uporabniku preskusne metode ni treba znova dokazovati za vsako uporabljeno serijo tkiv.

Obnovljivost

29. Rezultati pozitivnih in negativnih kontrol preskusne metode morajo dokazovati obnovljivost v daljšem časovnem obdobju.

Kontrola kakovosti

30. Konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, se lahko uporabi samo, če razvijalec/dobavitelj dokaže, da vsaka serija konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, izpolnjuje opredeljena merila za sprostitev proizvodnje, med katerimi sta najpomembnejši merili za viabilnost (odstavek 26) in pregradno funkcijo (glej odstavek 27). Razpon sprejemljivosti (zgornja in spodnja meja) za pregradne funkcije, izmerjene z ET_{50} ali IC_{50} (glej odstavka 25 in 26), mora določiti razvijalec/dobavitelj konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu. Razpon sprejemljivosti ET_{50} in IC_{50} , ki ga kot merilo za kontrolo kakovosti ob sprostitvi serij uporabi razvijalec/dobavitelj konstrukcij tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu (uporabljenih v VRM), je naveden v preglednici 3. Podatke, ki dokazujejo skladnost z vsemi merili za sprostitev proizvodnje, mora razvijalec/dobavitelj konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu, zagotoviti uporabnikom preskusne metode, da lahko te informacije vključijo v poročilo o preskusu. Za zanesljivo napoved kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti in označiti v zvezi z draženjem oči ali hudimi poškodbami oči v skladu z GHS ZN in uredbo CLP, se lahko sprejmejo samo rezultati, dobljeni s tkivi, ki izpolnjujejo vsa ta merila za sprostitev proizvodnje.

Preglednica 3

Merilo za kontrolo kakovosti ob sprostitvi serij

Preskus	Spodnja meja sprejemljivosti	Zgornja meja sprejemljivosti
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl Tritona X-100 s koncentracijo 0,3 vol. %)	ET ₅₀ = 12,2 min	ET ₅₀ = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (30-minutno tretiranje s 50 µl SDS)	IC ₅₀ = 1 mg/ml	IC ₅₀ = 3,2 mg/ml

Nanos preskusne kemikalije in kontrolnih snovi

31. Za vsako preskusno kemikalijo in vsako kontrolno snov je treba pri vsaki ponovitvi uporabiti vsaj dva ponovljena vzorca tkiva. Uporabljata se dva različna protokola tretiranja, in sicer eden za tekoče preskusne kemikalije in eden za trdne preskusne kemikalije (34) (35). Za obe metodi in protokola je treba površino konstrukcije tkiva pred nanosom preskusnih kemikalij navlažiti z Dulbeccovim fosfatnim pufrom s soljo (PBS) brez kalcija in magnezija (DPBS brez Ca²⁺/Mg²⁺), da se posnema vlažnost v človeškem očesu. Tretiranje tkiv se začne z izpostavitvijo preskusnim kemikalijam in kontrolnim snovem. Pri obeh protokolih tretiranja pri obeh VRM je treba nanesti zadostno količino preskusne kemikalije ali kontrolne snovi, da se enakomerno prekrije površina epitelija, pri čemer mora biti odmerek natančno določen (glej odstavek 32 in 33) (Dodatek 2).
32. Pri VRM se kot tekoče snovi obravnavajo preskusne kemikalije, ki jih je mogoče odmeriti s pipeto pri 37 °C ali nižjih temperaturah (po potrebi z uporabo pipete za neposredno izpodirvanje tlaka), sicer jih je treba obravnavati kot trdne snovi (glej odstavek 33). Pri VRM se tekoča preskusna kemikalija enakomerno porazdeli po površini tkiva (tj. vsaj 60 µl/cm² nanosa) (glej odstavek 2 (33) (34)). Kolikor je mogoče, je treba preprečiti kapilarne učinke (učinki površinske napetosti), ki se lahko pojavijo zaradi nanosa majhnih količin v vstavek (na površini tkiva), da se zagotovi pravilno odmerjanje tkiva. Tkiva, tretirana s tekočimi preskusnimi kemikalijami, se 30 minut inkubirajo pri standardnih pogojih gojenja (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost). Ob koncu obdobja izpostavljenosti je treba tekočo preskusno kemikalijo in kontrolne snovi pazljivo odstraniti s površine tkiva, in sicer z izdatnim spiranjem z DPBS brez Ca²⁺/Mg²⁺ pri sobni temperaturi. Tej fazi spiranja sledi potopitev v sveže gojišče po izpostavljenosti pri sobni temperaturi (da se odstrani preskusna kemikalija, ki se je morda absorbirala v tkivo) za predhodno določen čas, ki je odvisen od uporabljene VRM. Samo pri VMR1 se inkubacija po izpostavljenosti v svežem gojišču pri standardnih pogojih gojenja uporabi pred izvedbo analize MTT (glej Dodatek 2 (34) (35)).
33. Preskusne kemikalije, ki jih ni mogoče odmeriti s pipeto pri temperaturi do 37 °C, se pri VRM obravnavajo kot trdne snovi. Nanesti je treba zadostno količino preskusne kemikalije, da prekrije celotno površino tkiva, tj. nanesti je treba vsaj 60 mg/cm² (Dodatek 2). Če je mogoče, je treba trdne snovi preskusiti v obliki finega prahu. Tkiva, tretirana s trdnimi preskusnimi kemikalijami, se za predhodno določen čas (odvisno od uporabljene VRM) inkubirajo pri standardnih pogojih gojenja (glej Dodatek 2 (34) (35)). Ob koncu obdobja izpostavljenosti je treba trdno preskusno kemikalijo in kontrolne snovi pazljivo odstraniti s površine tkiva, in sicer z izdatnim spiranjem z DPBS brez Ca²⁺/Mg²⁺ pri sobni temperaturi. Tej fazi spiranja pred izvedbo analize MTT sledita potopitev v sveže gojišče po izpostavljenosti pri sobni temperaturi (da se odstrani preskusna kemikalija, ki se je morda absorbirala v tkivo) za predhodno določeno obdobje, ki je odvisno od uporabljene VRM, in inkubacija po izpostavljenosti v svežem gojišču pri standardnih pogojih gojenja (glej Dodatek 2 (34) (35)).

34. Pri vsaki ponovitvi je treba vključiti sočasno negativno in pozitivno kontrolo, da se dokaže, da sta viabilnost (določena pri negativni kontroli) in občutljivost (določena pri pozitivni kontroli) tkiv znotraj območij sprejemljivosti, opredeljenih na podlagi podatkov iz preteklih preskusov. Sočasna negativna kontrola je tudi izhodišče (100-odstotna viabilnost tkiva) za izračun relativnega deleža viabilnosti tkiv, tretiranih s preskusno kemikalijo (%Viabilnost_{preskus}). Priporočena snov za pozitivno kontrolo, ki se uporabi pri VRM, je čisti metilacetat (št. CAS 79-20-9, na trgu na voljo npr. pri podjetju Sigma-Aldrich, kat. št. 45997; tekočina). Priporočeni snovi za negativno kontrolo, ki se uporabita pri VRM1 in VRM2, sta ultra čista H₂O oziroma DPBS brez Ca²⁺/Mg²⁺. To so kontrolne snovi, ki so bile uporabljene v validacijskih študijah VRM in za katere obstaja največ podatkov iz preteklih preskusov. Uporaba ustreznih alternativnih snovi za pozitivno ali negativno kontrolo mora biti znanstveno in ustrezno utemeljena. Negativne in pozitivne kontrole je treba preskusiti z enakimi protokoli, kot so bili uporabljeni za preskusne kemikalije, vključene v ponovitev (tj. za tekoče in/ali trdne snovi). Temu nanosu morajo slediti izpostavljenost tretiranju, spiranje, poto-pitev po izpostavitvi in inkubacija po izpostavitvi, če je ustrezno, kot je opisano za kontrole, izvedene sočasno s tekočimi preskusnimi kemikalijami (glej odstavek 32), ali za kontrole, izvedene sočasno s trdnimi preskusnimi kemikalijami (glej odstavek 33), pred izvedbo analize MTT (glej odstavek 35) (34) (35). En sam niz negativne in pozitivne kontrole zadostuje za vse preskusne kemikalije v istem agregatnem stanju (tekoče ali trdne snovi), vključene v isto ponovitev.

Meritve viabilnosti tkiv

35. Analiza MTT je standardizirana kvantitativna metoda (16), ki jo je treba v okviru te preskusne metode uporabljati za merjenje viabilnosti tkiv. Ustreza uporabi tridimenzionalne konstrukcije tkiva. Analiza MTT se izvede takoj po obdobju inkubacije, ki sledi izpostavitvi. Pri VRM se vzorec konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelijskega tkiva, podobnega človeškemu roženičnemu, za 180 ± 15 minut potopi v 0,3 ml raztopine MTT s koncentracijo 1 mg/ml pri standardnih pogojih gojenja. Viabilne celice konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelijskega tkiva, podobnega človeškemu roženičnemu, reducirajo vitalno barvilo MTT v oborino modrega formazana MTT. Oborina modrega formazana MTT se nato ekstrahira iz tkiva z uporabo ustrezne količine izopropanola (ali podobnega topila) (34) (35). Tkiva, preskušena s tekočimi preskusnimi kemikalijami, je treba ekstrahirati iz zgornjega in spodnjega dela tkiv, tkiva, preskušena s trdnimi preskusnimi kemikalijami in obarvanimi tekočinami, pa je treba ekstrahirati samo iz spodnjega dela tkiva (da se zmanjša potencialna kontaminacija ekstrakcijske raztopine izopropanola s preskusno kemikalijo, ki je morda ostala na tkivu). Tkiva, preskušena s tekočimi preskusnimi kemikalijami, ki se težko sperejo, se prav tako lahko ekstrahirajo samo iz spodnjega dela. Sočasno preskušane snovi za negativno in pozitivno kontrolo je treba tretirati podobno kot preskusno kemikalijo. Ekstrahirani formazan MTT se lahko kvantitativno določi z meritvijo standardne absorbanke (OD) pri valovni dolžini 570 nm z uporabo filtrirane valovne dolžine največ ± 30 nm ali s postopkom spektrofotometrije HPLC/UPLC (glej odstavek 42) (11) (36).
36. Optične lastnosti preskusne kemikalije ali njenega kemijskega delovanja na MTT lahko ovirajo meritev formazana MTT, kar lahko povzroči lažno oceno viabilnosti tkiv. Preskusne kemikalije lahko vplivajo na meritev formazana MTT z neposredno redukcijo MTT v modri formazan MTT in/ali z barvno interferenco, če preskusna kemikalija naravno ali zaradi postopkov tretiranja absorbira v istem razponu optične gostote kot formazan MTT (tj. približno 570 nm). Pred preskušanjem je treba izvesti predhodna preverjanja, da se opredelijo morebitne snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in/ali kemikalije, ki povzročajo barvno interferenco, poleg tega je treba uporabiti dodatne kontrole, da se zazna in popravi morebitna interferenca zaradi takih preskusnih kemikalij (glej odstavke 37–41). To je še zlasti pomembno, če se določena preskusna kemikalija iz konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelijskega tkiva, podobnega človeškemu roženičnemu, s spiranjem ne odstrani v celoti ali če prodre v roženični epitelij, tako da je med analizo MTT prisotna v konstrukcijah tkiva rekonstruiranega epitelijskega tkiva, podobnega človeškemu roženičnemu. Za preskusne kemikalije, ki absorbirajo svetlobo v istem razponu kot formazan MTT (naravno ali po tretiranju) in zaradi premočne interference niso združljive z meritvijo standardne absorbanke (OD) formazana MTT, tj. močna absorpcija pri 570 ± 30 nm, se lahko za merjenje formazana MTT uporabi postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC (glej odstavka 41 in 42) (11) (36). Za podrobnejši opis načina zaznave in popravka neposredne redukcije MTT in vpliva barvil glej standardne delovne postopke za VRM (34) (35). V dodatkih III oziroma IV so na voljo tudi ponazoritveni shematski prikazi z navodili o tem, kako pri VRM1 in VRM2 opredeliti in obravnavati snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in/ali kemikalije, ki povzročajo barvno interferenco.

37. Za opredelitev morebitne interference zaradi preskusnih kemikalij, ki absorbirajo svetlobo v istem razponu kot formazan MTT (naravno ali po tretiranju), in odločitev, ali so potrebne dodatne kontrole, se preskusna kemikalija doda v vodo in/ali izopropanol ter ustrezno dolgo inkubira pri sobni temperaturi (glej Dodatek 2, (34) (35)). Če preskusna kemikalija v vodi in/ali izopropanolu absorbira dovolj svetlobe v razponu 570 ± 20 nm pri VRM1 (glej Dodatek 3) ali če pri mešanju preskusne kemikalije z vodo nastane obarvana raztopina pri VRM2 (glej Dodatek 4), se domneva, da preskusna kemikalija vpliva na meritev standardne absorbance (OD) formazana MTT, zato je treba izvesti dodatne kontrole z barvilom ali pa uporabiti postopek spektrofotometrije HPLC/UPLC, pri čemer v tem primeru te kontrole niso potrebne (glej odstavek 41 in 42 ter dodatka III in IV) (34) (35). Pri meritvi standardne absorbance (OD) je treba vsako motečo preskusno kemikalijo nanesti na vsaj dva ponovljena vzorca viabilnega tkiva, na katerih se izvede celotni postopek preskušanja, vendar se inkubirajo z gojiščem namesto z raztopino MTT v fazi inkubacije MTT, da se dobi kontrola z nespecifično barvo v živih tkivih ($NSC_{\text{živo}}$) (34) (35). Kontrolo z nespecifično barvo ($NSC_{\text{živo}}$) je treba izvesti sočasno s preskušanjem obarvane preskusne kemikalije, v primeru večkratnega preskušanja pa je treba zaradi inherentne biološke variabilnosti živih tkiv za vsak izvedeni preskus (pri vsaki ponovitvi) izvesti neodvisno kontrolo z nespecifično barvo ($NSC_{\text{živo}}$). Dejanska viabilnost tkiva se izračuna kot: delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z raztopino MTT ($\%Viabilnost_{\text{preskus}}$), od katerega se odšteje delež nespecifične barve, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z gojiščem brez MTT, kar se izvede sočasno s preskusom, ki se popravlja ($\%NSC_{\text{živo}}$), tj. dejanska viabilnost tkiva = $[\%Viabilnost_{\text{preskus}}] - [\%NSC_{\text{živo}}]$.
38. Za opredelitev snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, je treba vsako preskusno kemikalijo dodati v sveže pripravljeno raztopino MTT. Ustrezna količina preskusne kemikalije se doda v raztopino MTT in zmes se približno tri ure inkubira pri standardnih pogojih gojenja (glej dodatka III in IV) (34) (35). Če se zmes MTT, ki vsebuje preskusno kemikalijo (ali suspenzija pri netopnih preskusnih kemikalijah), obarva modro/vijolično, se šteje, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT, zato je treba izvesti dodatno funkcionalno preverjanje na neviabilnih konstrukcijah tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, in to neodvisno od uporabe meritve standardne absorbance (OD) ali postopka spektrofotometrije HPLC/UPLC. Pri tem dodatnem funkcionalnem preverjanju se uporabijo odmrla tkiva, ki imajo samo rezidualno presnovno aktivnost, vendar preskusno kemikalijo absorbirajo in zadržijo podobno kot živa tkiva. Odmrla tkiva za VRM1 se pripravijo z izpostavitvijo nizki temperaturi („odmrla zaradi zamrznitve“). Odmrla tkiva za VRM2 se pripravijo s podaljšano inkubacijo (npr. vsaj 24 ± 1 uro) v vodi, ki ji sledi hramba pri nizki temperaturi („odmrla v vodi“). Vsaka preskusna kemikalija, ki zmanjšuje MTT, se nanese na vsaj dva ponovljena vzorca odmrla tkiva, na katerih se opravi celoten postopek preskušanja za kontrolo z nespecifično redukcijo MTT ($NSMTT$) (34) (35). Za vsako preskusno kemikalijo zadostuje ena sama kontrola $NSMTT$, ne glede na število izvedenih samostojnih preskusov/ponovitev. Dejanska viabilnost tkiva se izračuna kot: delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi snovi, ki zmanjšuje MTT ($\%Viabilnost_{\text{preskus}}$), od katerega se odšteje delež nespecifične redukcije MTT, dobljen z odmrlimi tkivi, izpostavljenimi isti snovi, ki zmanjšuje MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja ($\%NSMTT$), tj. dejanska viabilnost tkiva = $[\%Viabilnost_{\text{preskus}}] - [\%NSMTT]$.
39. Pri preskusnih kemikalijah, za katere je ugotovljeno, da povzročajo barvno interferenco (glej odstavek 37) in neposredno zmanjšujejo MTT (glej odstavek 38), je poleg kontrol $NSMTT$ in $NSC_{\text{živo}}$, opisanih v prejšnjih odstavkih, potreben tudi tretji niz kontrol pri izvajanju meritve standardne absorbance (OD). To po navadi velja za temno obarvane preskusne kemikalije, ki absorbirajo svetlobo v razponu 570 ± 30 nm (npr. modre, vijoličaste, črne), ker njihova lastna barva ovira oceno njihove zmožnosti za neposredno redukcijo MTT, kot je opisana v odstavku 38. Zato je treba kot privzete uporabiti kontrole $NSMTT$ skupaj s kontrolami $NSC_{\text{živo}}$. Preskusne kemikalije, za katere se izvedejo tako kontrole $NSMTT$ kot kontrole $NSC_{\text{živo}}$, se lahko absorbirajo v živa in odmrla tkiva ter v njih zadržijo. Zato se v tem primeru s kontrolo $NSMTT$ lahko ne le popravi potencialna neposredna redukcija MTT zaradi preskusne kemikalije, ampak tudi barvna interferenca, ki nastane zaradi absorpcije in zadržanja preskusne kemikalije v odmrlih tkivih. To bi lahko vodilo do dvojnega popravka barvne interference, saj se s kontrolo $NSC_{\text{živo}}$ že popravi barvna interferenca, ki jo povzročata absorpcija in zadržanje preskusne kemikalije v živih tkivih. Za preprečitev morebitnega dvojnega popravka barvne interference je treba izvesti še tretjo kontrolo za nespecifično barvo v

odmrlih tkivih (NSC_{odmrlo}) (glej dodatka III in IV) (34) (35). Pri tej dodatni kontroli se preskusna kemikalija nanese na vsaj dva ponovljena vzorca odmrlega tkiva, na katerih se izvede celoten postopek preskušanja, vendar se v fazi inkubacije MTT inkubirata z gojiščem namesto z raztopino MTT. Za vsako preskusno kemikalijo zadostuje ena sama kontrola NSC_{odmrlo} ne glede na število izvedenih neodvisnih preskusov/ponovitev, vendar jo je treba izvesti sočasno s kontrolo NSMTT in z isto serijo tkiva. Dejanska viabilnost tkiva se izračuna kot: delež viabilnosti tkiva, dobljen z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji ($\%Viabilnost_{preskus}$), od katerega se odštejeta $\%NSMTT$ in $\%NSC_{zivo}$, prišteje pa se mu delež nespecifične barve, dobljen z odmrlimi tkivi, izpostavljenimi moteči preskusni kemikaliji in inkubiranimi z medijem brez MTT, izračunan glede na negativno kontrolo, izvedeno sočasno s preskusom, ki se popravlja ($\%NSC_{odmrlo}$), tj. dejanska viabilnost tkiva = $[\%Viabilnost_{preskus}] - [\%NSMTT] - [\%NSC_{zivo}] + [\%NSC_{odmrlo}]$.

40. Pomembno je poudariti, da se lahko zaradi nespecifične redukcije MTT in nespecifičnih barvnih interferenc poveča optična gostota (pri izvajanju meritev standardne absorbance) izvlečka tkiva nad razponom linearnosti spektrofotometra ter da se lahko tudi zaradi nespecifične redukcije MTT poveča površina vrha formazana MTT (pri izvajanju meritev spektrofotometrije HPLC/UPLC) izvlečka tkiva nad razponom linearnosti spektrofotometra. Na tej podlagi je pomembno, da vsak laboratorij najprej določi razpon linearnosti optične gostote/površine vrha svojega spektrofotometra, npr. s formazanom MTT (št. CAS 57360-69-7), ki je na trgu na voljo npr. pri podjetju Sigma-Aldrich (kat. št. M2003), šele nato lahko začne preskušanje preskusnih kemikalij za regulativne namene.

41. Meritev standardne absorbance (OD) z uporabo spektrofotometra je ustrezna za oceno snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in preskusnih kemikalij, ki povzročajo barvno interferenco, ko zaznana interferenca z meritvijo formazana MTT ni premočna (tj. optične gostote izvlečkov tkiv, dobljene s preskusno kemikalijo brez kakršnega koli popravka za neposredno redukcijo MTT in/ali barvno interferenco, so znotraj linearnega razpona spektrofotometra). Vendar je treba rezultate za preskusne kemikalije, ki povzročajo $\%NSMTT$ in/ali $\%NSC_{zivo} \geq 60\%$ (VRM1 in VRM2 za protokole za tekoče snovi) ali 50% negativne kontrole (VRM2 za protokole za trdne snovi), obravnavati previdno, saj je to določena mejna vrednost, ki se uporablja pri VRM za razlikovanje med razvrščenimi in nerazvrščenimi kemikalijami (glej odstavek 44). Vendar standardne absorbance (OD) ni mogoče meriti, kadar je interferenca z meritvijo formazana MTT premočna (tj. povzroča nepopravljene OD izvlečkov preskusnih tkiv, ki presegajo linearni razpon spektrofotometra). Obarvane preskusne kemikalije ali preskusne kemikalije, ki se obarvajo ob stiku z vodo ali izopropanolom, ki premočno vplivajo na meritev standardne absorbance (OD) formazana MTT, se še vedno lahko ocenijo z uporabo spektrofotometrije HPLC/UPLC (glej dodatka III in IV). Sistem HPLC/UPLC namreč omogoča, da se formazan MTT pred kvantifikacijo loči od kemikalije (36). Iz tega razloga kontrole NSC_{zivo} ali NSC_{odmrlo} pri uporabi spektrofotometrije HPLC/UPLC niso nikoli potrebne, in to ne glede na to, katera kemikalija se preskuša. Kljub temu je treba kontrole NSMTT uporabiti v primeru suma, da preskusna kemikalija neposredno zmanjšuje MTT (z uporabo postopka, opisanega v odstavku 38). Kontrole NSMTT je treba uporabiti tudi pri preskusnih kemikalijah, katerih barva (njihova lastna ali tista, ki se pojavi, ko je preskusna kemikalija v vodi) ovira oceno njihove sposobnosti za neposredno redukcijo MTT, kot je opisano v odstavku 38. Kadar se za merjenje formazana MTT uporabi spektrofotometrija HPLC/UPLC, se delež viabilnosti tkiva izračuna kot razmerje med površino vrha formazana MTT, dobljeno z živimi tkivi, izpostavljenimi preskusni kemikaliji, in površino vrha formazana MTT, dobljeno s sočasno negativno kontrolo. Za preskusne kemikalije, ki lahko neposredno zmanjšajo MTT, se dejanska viabilnost tkiva izračuna kot: $\%Viabilnost_{preskus} - \%NSMTT$, kot je opisano v zadnjem stavku odstavka 38. Nazadnje, opozoriti je treba, da snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, ali snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT in lahko povzročijo tudi barvno interferenco ter po tretiranju ostanejo v tkivih in zmanjšujejo MTT tako močno, da optične gostote (z uporabo standardne meritve optične gostote) ali površine vrha (z uporabo spektrofotometrije UPLC/HPLC) preskušanih izvlečkov tkiv, ki presegajo linearni razpon spektrofotometra, s preskusnimi metodami rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, ni mogoče oceniti, čeprav naj bi se to zgodilo samo v zelo redkih primerih.

42. Spektrofotometrija HPLC/UPLC se lahko za merjenje formazana MTT uporabi z vsemi vrstami preskusnih kemikalij (obarvanimi, neobarvanimi, kemikalijami, ki zmanjšujejo MTT, in tistimi, ki ne zmanjšujejo MTT) (11) (36). Zaradi raznovrstnosti sistemov spektrofotometrije HPLC/UPLC ni mogoče, da bi vsak uporabnik določil popolnoma enake sistemske pogoje. Tako je treba ustreznost sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC dokazati pred njegovo uporabo za kvantifikacijo formazana MTT iz izvlečkov tkiv, tako da izpolnjuje merila za sprejemljivost za niz standardnih parametrov ustreznosti na podlagi tistih, ki so opisani v smernicah ameriške uprave za hrano in zdravila za industrijo v zvezi z bioanalitično metodo validacije (36) (38). Ti ključni parametri in njihova merila za sprejemljivost so prikazani v Dodatku 5. Ko so izpolnjena merila za sprejemljivost, opredeljena v Dodatku 5, se sistem spektrofotometrije HPLC/UPLC šteje za ustrezen in pripravljen za merjenje formazana MTT v poskusnih pogojih, opisanih v tej preskusni metodi.

Merila za sprejemljivost

43. Za vsako ponovitev, pri kateri se uporabljajo serije konstrukcij tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, ki ustrezajo kontroli kakovosti (glej odstavek 30), morajo tkiva, tretirana z negativno kontrolno snovjo, izražati optično gostoto, iz katere je razvidna kakovost tkiv, pri katerih so se upoštevale zahtevane stopnje in vsi postopki protokola, ter ne smejo biti zunaj mej, določenih s preteklimi preskusi in opisanih v preglednici 2 (glej odstavek 26). Podobno morajo tkiva, tretirana s pozitivno kontrolno snovjo, tj. metilacetatom, imeti srednjo viabilnost $< 50 \%$ glede na negativno kontrolo pri VRM1 s protokolom za tekoče snovi ali protokolom za trdne snovi ter $\leq 30 \%$ (protokol za tekoče snovi) ali $\leq 20 \%$ (protokol za trdne snovi) glede na negativno kontrolo pri VRM2, s čimer kažejo sposobnost tkiv, da se odzovejo na dražilno preskusno kemikalijo v pogojih preskusne metode (34) (35). Variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv s preskusnimi kemikalijami in kontrolnimi snovmi mora biti znotraj sprejemljivih mej (tj. razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiva mora biti manjša od 20% oziroma standardni odklon med tremi ponovljenimi vzorci tkiv ne sme presegati 18%). Če je negativna ali pozitivna kontrola, vključena v ponovitev, zunaj sprejemljivih razponov, se ponovitev šteje za „neveljavno“ in jo je treba ponoviti. Če je variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv s preskusno kemikalijo zunaj sprejemljivega razpona, je treba preskus šteti za „neveljaven“, preskusno kemikalijo pa je treba znova preskusiti.

Razlaga rezultatov in napovedni model

44. Vrednosti optične gostote/površine vrha, dobljene s ponovljenimi vzorci izvlečkov tkiv za vsako preskusno kemikalijo, je treba uporabiti za izračun povprečnega deleža viabilnosti tkiv (srednja vrednost med ponovljenimi vzorci tkiv), normaliziranega na negativno kontrolo, katere viabilnost znaša 100% . Mejna vrednost deleža viabilnosti tkiv za opredelitev preskusnih kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči (brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP), je navedena v preglednici 4. Rezultate je torej treba razlagati, kot je navedeno v nadaljevanju.

- Za preskusno kemikalijo se šteje, da je ni treba razvrstiti in označiti v skladu z GHS ZN in uredbo CLP (brez kategorije), če je povprečni delež viabilnosti tkiv po izpostavljenosti in inkubaciji po izpostavljenosti večji od ($>$) določene mejne vrednosti deleža viabilnosti tkiv, kot je prikazano v preglednici 4. V tem primeru ni potrebno nadaljnje preskušanje z drugimi preskusnimi metodami.
- Če povprečni delež viabilnosti tkiv po izpostavljenosti in inkubaciji po izpostavljenosti znaša manj ali enako ($\leq$) kot določena mejna vrednost deleža viabilnosti tkiv, napoved ni mogoča, kot je prikazano v preglednici 4. V tem primeru je potrebno dodatno preskušanje z drugimi preskusnimi metodami, ker preskusne metode rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, kažejo določeno število lažno pozitivnih rezultatov (glej odstavka 14 in 15) in ne omogočajo razlikovanja med kategorijama 1 in 2 po GHS ZN in uredbi CLP (glej odstavek 17).

Preglednica 4

Napovedni modeli glede na razvrstitev po GHS ZN in uredbi CLP

VRM	Brez kategorije	Napoved ni mogoča
VRM 1 – EpiOcular™ EIT (za oba protokola)	srednja viabilnost tkiv > 60 %	srednja viabilnost tkiv ≤ 60 %
VRM 2 – SkinEthic™ HCE EIT (za protokol za tekoče snovi)	srednja viabilnost tkiv > 60 %	srednja viabilnost tkiv ≤ 60 %
VRM2 – SkinEthic™ HCE EIT (za protokol za trdne snovi)	srednja viabilnost tkiv > 50 %	srednja viabilnost tkiv ≤ 50 %

45. Kadar je rezultat nedvoumen, bi moral za preskusno kemikalijo zadoščati en sam preskus, sestavljen iz vsaj dveh ponovljenih vzorcev tkiv. V primeru mejnih rezultatov, kot so neskladne ponovne meritve in/ali povprečni delež viabilnosti tkiv, enak $60 \pm 5\%$ (VRM1 in VRM2 za protokol za tekoče snovi) ali $50 \pm 5\%$ (VRM2 za protokol za trdne snovi), pa je morda treba izvesti še drug preskus in nato še tretjega, če rezultati prvih dveh preskusov niso skladni.
46. Za posamezne vrste zmesi se lahko uporabijo različne mejne vrednosti deleža viabilnosti, tako da se razlikuje med razvrščenimi in nerazvrščenimi preskusnimi kemikalijami, če je to ustrezno in utemeljeno, da se poveča splošna učinkovitost preskusne metode za zadevne vrste zmesi (glej odstavek 14). Primerjalne kemikalije so lahko primerne za ocenjevanje potenciala za hude poškodbe oči/draženje oči, ki ga imajo neznane preskusne kemikalije ali proizvodni razred, ali za ocenjevanje relativnega potenciala toksičnosti razvrščene kemikalije za oči v določenem razponu pozitivnih odzivov.

PODATKI IN POROČANJE

Podatki

47. Podatke o posameznih ponovljenih vzorcih tkiv v ponovitvi (npr. vrednosti optične gostote/površine vrha formazana MTT in podatke o izračunanem deležu viabilnosti tkiv za preskusno kemikalijo in kontrole ter končno napoved s preskusno metodo rekonstruiranega epitelija, podobnega človeškemu roženičnemu) je treba v preglednici navesti za vsako preskusno kemikalijo, po potrebi vključno s podatki iz ponovljenih preskusov. Poleg tega je treba za vsako posamezno preskusno kemikalijo in kontrolo navesti povprečni delež viabilnosti tkiv in razliko v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv (če je $n = 2$ ponovljena vzorca tkiv) ali standardni odklon (če je $n \geq 3$ ponovljeni vzorci tkiv). Morebitne opažene interference preskusne kemikalije pri meritvi formazana MTT z neposrednim zmanjšanjem MTT in/ali barvno interferenco je treba navesti za vsako preskušeno kemikalijo.

Poročilo o preskusu

48. V poročilu o preskusu je treba navesti informacije, kot so predstavljene v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija

Snov iz ene sestavine

- Kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, registrska številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- agregatno stanje, hlapnost, vrednost pH, LogP, molekulska masa, kemijski razred in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, če so na voljo;

- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi

- Čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;
- agregatno stanje in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, če so na voljo;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo.

Pozitivne in negativne kontrolne snovi

- Kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, registrska številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- agregatno stanje, hlapnost, molekulska masa, kemijski razred in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti, pomembne za izvedbo študije, če so na voljo;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev uporabe druge negativne kontrole in ne ultra čiste H₂O ali DPBS brez Ca²⁺/Mg²⁺, če je ustrezno;
- utemeljitev uporabe druge pozitivne kontrole in ne metilacetata, če je ustrezno;
- sklicevanje na rezultate pozitivnih in negativnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev.

Podatki o naročniku in preskuševalnem laboratoriju

- Ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije.
- Uporabljena konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, in protokol (z navedbo utemeljitve izbire, če je ustrezno)

Pogoji preskusne metode

- Uporabljena konstrukcija tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, vključno s številko serije;
- valovna dolžina in filtrirana valovna dolžina (če je ustrezno), ki se uporabljata za kvantifikacijo formazana MTT, ter linearni razpon merilne naprave (npr. spektrofotometra);
- opis metode, uporabljene za kvantifikacijo formazana MTT;
- opis uporabljenega sistema spektrofotometrije HPLC/UPLC, če je ustrezno;
- popolne informacije v podporo specifični uporabljeni konstrukciji tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, vključno z njeno učinkovitostjo. To mora med drugim vključevati:
 - i) kontrolo kakovosti viabilnosti (dobavitelj);
 - ii) viabilnost v pogojih preskusne metode (uporabnik);
 - iii) kontrolo kakovosti pregradne funkcije;
 - iv) morfologijo, če je na voljo;
 - v) obnovljivost in napovedljivost;
 - vi) druge kontrole kakovosti konstrukcije tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, če so na voljo;
- navedbe podatkov o konstrukciji tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, pridobljene s preteklimi preskusi. To mora med drugim vključevati: sprejemljivost podatkov o kontroli kakovosti s sklicevanjem na podatke o seriji, pridobljene v preteklosti;
- izjava, da je preskusni laboratorij s preskušanjem kemikalij za preverjanje usposobljenosti dokazal usposobljenost za uporabo preskusne metode pred redno uporabo.

Merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa

- Srednje vrednosti pozitivne in negativne kontrole ter razponi sprejemljivosti na podlagi podatkov iz preteklih preskusov;
- sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za pozitivne in negativne kontrole;
- sprejemljiva variabilnost med ponovljenimi vzorci tkiv za preskusno kemikalijo.

Preskusni postopek

- Podrobni podatki o uporabljenem preskusnem postopku;
- uporabljeni odmerki preskusne kemikalije in kontrolnih snovi;
- trajanje in temperatura izpostavljenosti, potopitve po izpostavljenosti in obdobja inkubacije po izpostavljenosti (če je ustrezno);
- opis morebitnih prilagoditev preskusnega postopka;

- navedba kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšajo MTT, in/ali barvilnih preskusnih kemikalij, če je ustrezno;
- število ponovljenih vzorcev tkiv, uporabljenih za vsako preskusno kemikalijo in kontrole (pozitivna kontrola, negativna kontrola, NSMTT, NSC_{živo} in NSC_{odmrlo}, če je ustrezno).

Rezultati

- Preglednice s podatki o posameznih preskusnih kemikalijah in kontrolnih snoveh za vsako ponovitev (vključno s ponovljenimi poskusi, če je ustrezno) in vsako ponovljeno meritev, vključno z vrednostjo optične gostote in površino vrha formazana MTT, deležem viabilnosti tkiv, povprečnim deležem viabilnosti tkiv, razliko med ponovljenimi vzorci tkiv ali standardnimi odkloni, in končna napoved;
- če je ustrezno, rezultati kontrol, uporabljenih za snovi, ki neposredno zmanjšujejo MTT, in/ali obarvane preskusne kemikalije, vključno z vrednostjo optične gostote ali površino vrha formazana MTT, %NSMTT, %NSC_{živo}, %NSC_{odmrlo}, razliko med ponovljenimi vzorci tkiv ali standardnim odklonom, končnim pravilnim deležem viabilnosti tkiv, in končna napoved;
- rezultati, dobljeni s preskusnimi kemikalijami in kontrolnimi snovmi glede na opredeljena merila za sprejemljivost ponovitve in preskusa;
- opis drugih opaženih učinkov, npr. obarvanja tkiv z obarvano preskusno kemikalijo.

Razprava o rezultatih

Sklepna ugotovitev

VIRI

- (1) ZN (2015). Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, šesta revidirana izdaja, New York in Ženeva: Združeni narodi. Na voljo na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (2) Poglavje B.5 te priloge: Akutno draženje oči/jedkost za oči.
- (3) Poglavje B.47 te priloge: Preskusna metoda za določanje motnjave in prepustnosti roženice goveda za opredelitev (i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in (ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči.
- (4) Poglavje B.48 te priloge: Preskusna metoda na izoliranih očeh piščancev za opredelitev (i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in (ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti.
- (5) Poglavje B.61 te priloge: Preskusna metoda uhajanja fluoresceina za opredeljevanje jedkih in zelo dražilnih snovi za oči.
- (6) Poglavje B.68 te priloge: *In vitro* preskusna metoda kratkotrajne izpostavljenosti za opredelitev (i) kemikalij, ki povzročajo hude poškodbe oči, in (ii) kemikalij, ki jih ni treba razvrstiti glede na draženje oči ali hude poškodbe oči.
- (7) Freeman, S. J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261–266.

- (8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Na voljo na: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
- (9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. Mnenje ESAC št. 2014-03 z dne 17. novembra 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Na voljo na: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>.
- (10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M. H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C. S., Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43–53.
- (11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M. H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C. J., Toner, F., Roper, C. S., Van Rompay, A. R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55–70.
- (12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Mnenje ESAC št. 2016-02 z dne 24. junija 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Na voljo na: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704>.
- (13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Rokopis v pripravi).
- (14) Draize, J. H., Woodard, G., Calvery, H. O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377–390.
- (15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1–9.
- (16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- (17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment (št. 216): Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment (št. 34): Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

- (19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., in Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339–364.
- (20) Nguyen, D. H., Beuerman, R. W., De Wever, B., in Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. V: Salem, H., Katz, S. A. (ur.). *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, str. 147–159.
- (21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., in Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619–626.
- (22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., in McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476–1488.
- (23) Kolle, S. N., Moreno, M. C. R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., in Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1–18.
- (24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., in Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701–723.
- (25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K. R., Millet, M., Templier, M., in McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521–547.
- (26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., in Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113–126.
- (27) Hackett, R. B., in McDonald, T. O. (1991). Eye Irritation. V: *Advances in Modern Toxicology: Dermatotoxicology*, Marzulli, F. N., in Maibach, H. I. (ur.). 4. izdaja, str. 749–815. Washington, DC, ZDA: Hemisphere Publishing Corporation.
- (28) Fox, D. A., in Boyes, W. K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. V: *Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, Klaassen, C. D. (ur.). 7. izdaja, str. 665–697. Withby, ON, Kanada: McGraw-Hill Ryerson.
- (29) Jester, J. V., Li, H. F., Petroll, W. M., Parker, R. D., Cavanagh, H. D., Carr, G. J., Smith, B., in Maurer, J. K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.

- (30) Maurer, J. K., Parker, R. D., in Jester, J. V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106–117.
- (31) Jester, J. V., Li, L., Molai, A., in Maurer, J. K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115–130.
- (32) Jester, J. V., Petroll, W. M., Bean, J., Parker, R. D., Carr, G. J., Cavanagh, H. D., in Maurer, J. K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610–2625.
- (33) Jester, J. V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41–54.
- (34) EpiOcular™ EIT SOP, različica 8 (5. marec 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Na voljo na: [<https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>].
- (35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, različica 1. (20. julij 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Na voljo na: <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>.
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K. R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., in McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741–761.
- (37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., in Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101–127.
- (38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Maj 2001. Na voljo na: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- (39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment (št. 263). ENV Publications, Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusne metode s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusne metode in eden od vidikov „ustreznosti“. Ta izraz in izraz „skladnost“ se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusne metode (18).

Primerjalna kemikalija: kemikalija, ki se uporablja kot standard za primerjavo s preskusno kemikalijo. Primerjalna kemikalija mora imeti naslednje značilnosti: (i) ima trajen in zanesljiv vir za njeno opredelitev in določitev lastnosti; (ii) je strukturno, funkcijsko in/ali kemijsko podobna kemikalijam, ki se preskušajo, ali spada v podoben kemijski razred; (iii) ima znane fizikalno-kemijske lastnosti; (iv) ima spremne podatke o znanih učinkih in (v) ima znano moč v razponu zelenega odziva.

Pristop od spodaj navzgor: stopenjski pristop, ki se uporablja za preskusno kemikalijo, za katero se domneva, da ne potrebuje razvrstitve in označevanja glede na draženje oči ali hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki ne potrebujejo razvrstitve ali označevanja (negativni rezultat), nato pa druge kemikalije (pozitivni rezultat).

Kemikalija: snov ali zmes.

Skladnost: glej „točnost“.

Roženica: prozoren sprednji del zrkla, ki pokriva šarenico in zenico ter skozi katerega vstopa svetloba.

KV: koeficient variacije.

Dev.: odklon.

EIT: preskus draženja oči.

EURL ECVAM: European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (referenčni laboratorij Evropske unije za alternative testiranju na živalih).

Draženje oči: je povzročitev sprememb v očesu po nanosu preskusne kemikalije na sprednjo površino očesa, ki so v celoti popravljive v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za „popravljive učinke na oči“ in „kategorijo 2 po GHS ZN/uredbi CLP“.

ET₅₀: čas izpostavljenosti, ki je potreben za zmanjšanje viabilnosti tkiv za 50 % po nanosu določene stalne koncentracije primerjalne kemikalije.

Delež lažno negativnih rezultatov: delež vseh pozitivnih snovi, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot negativne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Delež lažno pozitivnih rezultatov: delež vseh negativnih snovi, ki jih preskusna metoda zmotno prikaže kot pozitivne. To je eden od kazalnikov učinkovitosti preskusne metode.

Nevarnost: neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki lahko ob izpostavljenosti temu sredstvu povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium.

HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography).

IC₅₀: koncentracija, pri kateri primerjalna kemikalija po določenem času izpostavljenosti (npr. 30-minutnem tretiranju s SDS) zmanjša viabilnost tkiv za 50 %.

Prevelik odmerek: količina na konstrukcijo tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, nanesene preskusne kemikalije, ki je večja od količine, potrebne za celotno in enakomerno prekritje površine epitelijskega tkiva.

Nepopravljivi učinki na oči: glej „Huda poškodba oči“.

LLOQ: spodnja meja določljivosti.

LogP: logaritem porazdelitvenega koeficienta n-oktanol/voda.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

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

Negativna kontrola: vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da ne povzroči pozitivnega odziva v preskusnem sistemu. Ta vzorec se obdelava z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci ter uporabi za določitev 100-odstotne viabilnosti tkiv.

Brez razvrstitve: kemikalije, ki niso razvrščene glede na draženje oči (kategorija 2 po GHS ZN/uredbi CLP, kategorija 2A ali 2B po GHS ZN) ali hude poškodbe oči (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP). Ta pojem je sopomenka za „brez kategorije po GHS ZN/uredbi CLP“.

NSC_{odmrlo}: nespecifična barva v odmrlih tkivih.

NSC_{živo}: nespecifična barva v živih tkivih.

NSMTT: nespecifična redukcija MTT.

OD: optična gostota.

Standardi izvajanja: standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi, ki se je štela za znanstveno veljavno, in so podlaga za oceno primerljivosti predlagane preskusne metode, ki je funkcijsko in mehanistično podobna. Vključujejo: (i) nujne elemente preskusne metode; (ii) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (iii) primerljive stopnje točnosti in zanesljivosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, ki jih mora dokazati predlagana preskusna metoda pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (18).

Pozitivna kontrola: vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv v preskusnem sistemu. Ta vzorec se obdelava z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti prevelika.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere se s preskusom pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusne metode (18).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusne metode v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Ocenijo se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (18).

Nadomestni preskus: preskus, ki nadomesti preskus, ki se redno uporablja in je uveljavljen za ugotavljanje nevarnosti in/ali oceno tveganja, ter za katerega je bilo ugotovljeno, da v primerjavi z uveljavljenim preskusom v vseh mogočih okoliščinah preskušanja in za vse mogoče preskusne kemikalije zagotavlja enakovredno ali izboljšano varstvo zdravja ljudi ali živali ali okolja, kot je ustrezno (18).

Obnovljivost: ujemanje rezultatov, pridobljenih s preskušanjem iste kemikalije in uporabo istega preskusnega protokola (glej „Zanesljivost“) (18).

Popravljalni učinki na oči: glej „Draženje oči“.

RhCE: rekonstruiran epitelij, podoben človeškemu roženičnemu.

Ponovitev: ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušanih sočasno z negativno kontrolo in pozitivno kontrolo.

SO: standardni odklon.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (18).

Huda poškodba oči: povzročitev poškodbe očesnega tkiva ali resne fizične okvare vida po nanosu preskusne snovi na sprednjo površino očesa, ki ni v celoti popravljena v 21 dneh po nanosu. Ta pojem je sopomenka za „nepopravljive učinke na oči“ in „kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi LP“.

Standardni delovni postopki: formalni pisni postopki, ki podrobno opisujejo, kako je treba izvesti posamezne rutinske in s preskusom povezane laboratorijske postopke. Zahtevajo se z dobro laboratorijsko prakso.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih preskusnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskusno metodo, s katero se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusne metode (18).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Preskus: sočasno preskušanje iste preskusne kemikalije na vsaj dveh ponovljenih vzorcih tkiv, kot je opredeljeno v zadevnem standardnem delovnem postopku.

Viabilnost tkiv: parameter za merjenje celotne dejavnosti celične populacije v rekonstruiranem tkivu kot njihove zmožnosti za redukcijo vitalnega barvila MTT, ki se glede na izmerjeno končno točko in uporabljeni načrt preskusa ujema s skupnim številom in/ali vitalnostjo živih celic.

Pristop od zgoraj navzdol: stopenjski pristop, ki se uporablja za kemikalijo, za katero se domneva, da povzroča hude poškodbe oči, pri čemer se najprej določijo kemikalije, ki jih je treba razvrstiti (pozitivni rezultat), nato pa še druge kemikalije (negativni rezultat).

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Večstopenjska strategija preskušanja: stopenjska strategija preskušanja, pri kateri se preskusne metode uporabijo zaporedoma. Na vsaki stopnji se pregledajo vsi obstoječi podatki o preskusni kemikaliji, pri čemer se uporabi postopek, ki temelji na zanesljivosti dokazov, da se določi, ali je pred nadaljevanjem na naslednji stopnji na voljo dovolj podatkov za odločitev o razvrstitvi kemikalije glede na nevarnost, ki jo povzroča. Če se za preskusno kemikalijo na podlagi razpoložljivih podatkov lahko določi potencial nevarnosti/jakost, dodatno preskušanje ni potrebno (18).

ULOQ: zgornja meja določljivosti.

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (1).

Kategorija 1 po GHS ZN in uredbi CLP: glej „Huda poškodba oči“.

Kategorija 2 po GHS ZN in uredbi CLP: glej „Draženje oči“.

Brez kategorije po GHS ZN in uredbi CLP: kemikalije, ki ne izpolnjujejo zahtev za razvrstitev v kategorijo 1 ali 2 po GHS ZN/uredbi CLP (ali kategorijo 2A ali 2B po GHS ZN). Ta pojem je sopomenka za „brez razvrstitve“.

UPLC: tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (Ultra-High Performance Liquid Chromatography).

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

Veljavna preskusna metoda: preskusna metoda, ki se obravnava kot dovolj ustrezna in zanesljiva za določeni namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih. Preskusna metoda ni nikoli veljavna v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom (18).

Validirana preskusna metoda: preskusna metoda, za katero sta bili na podlagi izvedenih validacijskih študij določeni ustreznost (vključno s točnostjo) in zanesljivost za določen namen. Opozoriti je treba, da točnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bila sprejemljiva za predlagani namen (18).

VRM: validirana referenčna metoda.

VRM1: Kot validirana referenčna metoda 1 je naveden EpiOcular™ EIT.

VRM2: Kot validirana referenčna metoda 2 je naveden SkinEthic™ HCE EIT.

Zanesljivost dokazov: postopek obravnavanja prednosti in slabosti različnih informacij v okviru sprejemanja in utemeljevanja sklepne ugotovitve glede potenciala nevarnosti preskusne snovi.

Dodatek 2

GLAVNI ELEMENTI PRESKUSOV REKONSTRUIRANEGA EPITELIJA, PODOBNEGA ČLOVEŠKEMU ROŽENIČNEMU (RHE), VALIDIRANIH ZA OPREDELITEV KEMIKAJI, KI JIH NI TREBA RAZVRSTITI IN OZNAČITI V ZVEZI Z DRAŽENJEM OČI ALI HUDIMI POŠKODBAMI OČI

Elementi preskusa	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
	Tekoče snovi (ki jih je mogoče odmeriti s pipeto pri 37 ± 1 °C ali nižjih temperaturah za 15 min)	Trdne snovi (ki jih ni mogoče odmeriti s pipeto)	Tekoče in viskozne snovi (ki jih je mogoče odmeriti s pipeto)	Trdne snovi (ki jih ni mogoče odmeriti s pipeto)
Površina modela	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²	0,5 cm ²
Število ponovljenih vzorcev tkiv	vsaj 2	vsaj 2	vsaj 2	vsaj 2
Predhodno preverjanje barvne interference	50 µl + 1 ml H ₂ O za 60 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95-odstotna relativna vlažnost (neobarvane preskusne kemikalije) ali 50 µl + 2 ml izopropanola, ki se 2–3 ure meša pri sobni temperaturi (obarvane preskusne kemikalije) → če je optična gostota preskusne kemikalije pri 570 ± 20 nm, potem ko se odšteje optična gostota izopropanola ali vode, > 0,08 (kar ustreza približno 5 % srednje optične gostote negativne kontrole), je treba izvesti žive prilagojene kontrole.	50 mg + 1 ml H ₂ O za 60 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95-odstotna relativna vlažnost (neobarvane preskusne kemikalije) in/ali 50 mg + 2 ml izopropanola, ki se 2–3 meša ure pri sobni temperaturi (obarvane in neobarvane preskusne kemikalije) → če je optična gostota preskusne kemikalije pri 570 ± 20 nm, potem ko se odšteje optična gostota izopropanola ali vode, > 0,08 (kar ustreza približno 5 % srednje optične gostote negativne kontrole), je treba izvesti žive prilagojene kontrole.	10 µl + 90 µl H ₂ O se mešata 30 ± 2 min pri sobni temperaturi (18–28 °C) → če je preskusna kemikalija obarvana, je treba izvesti žive prilagojene kontrole.	10 mg + 90 µl H ₂ O se mešata 30 ± 2 min pri sobni temperaturi → če je preskusna kemikalija obarvana, je treba izvesti žive prilagojene kontrole.

Elementi preskusa	EpiOcular™ EIT (VRM 1)	SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)
Predhodno preverjanje neposredne redukcije MTT	50 µl + 1 ml raztopine MTT s koncentracijo 1 mg/ml za 180 ± 15 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrliimi zaradi zamrznitve (za negativno kontrolo se uporabi 50 µl sterilne deionizirane vode v raztopini MTT).	30 µl + 300 µl raztopine MTT s koncentracijo 1 mg/ml za 180 ± 15 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost → če se raztopina obarva modro/vijolično, je treba izvesti prilagojene kontrole s tkivi, odmrliimi v vodi (za negativno kontrolo se uporabi 30 µl sterilne deionizirane vode v raztopini MTT).
Predhodno tretiranje	20 µl DPBS brez Ca²⁺/Mg²⁺ za 30 ± 2 min pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost, zaščiteno pred svetlobo.	–
Odmerki pri tretiranju in nanos	50 µl (83,3 µl/cm²)	10 µl DPBS brez Ca²⁺/Mg²⁺ + 30 ± 2 µl (60 µl/cm²) Za viskozne snovi uporabite najlonsko mrežico.
Izpostavljenostin temperatura izpostavljenosti	30 min (± 2 min) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost	4 ure (± 0,1 ure) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂, ≥ 95-odstotna relativna vlažnost

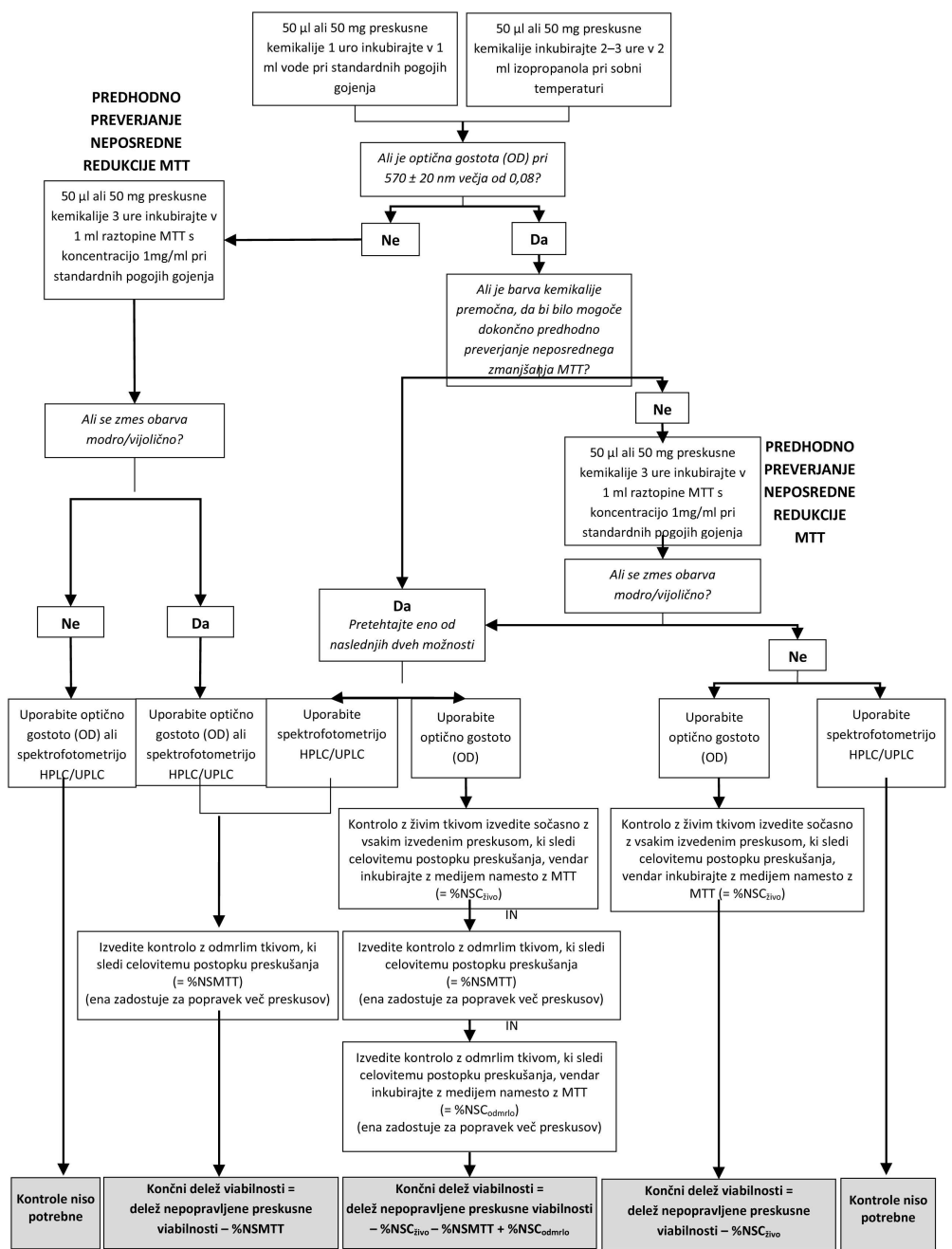
Elementi preskusa	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Spiranje pri sobni temperaturi	trikrat v 100 ml DPBS brez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	trikrat v 100 ml DPBS brez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	20 ml DPBS brez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	25 ml DPBS brez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
Potopitev po izpostavljenosti	12 min (± 2 min) pri sobni temperaturi v gojišču	25 min (± 2 min) pri sobni temperaturi v gojišču	30 min (± 2 min) pri 37 °C, 5 % CO_2 , 95-odstotni relativni vlažnosti v gojišču	30 min (± 2 min) pri sobni temperaturi v gojišču
Inkubacija po izpostavljenosti	120 min (± 15 min) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2 , ≥ 95 -odstotna relativna vlažnost	18 ur ($\pm 0,25$ ure) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2 , ≥ 95 -odstotna relativna vlažnost	brez	18 ur ($\pm 0,5$ ure) v gojišču pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2 , ≥ 95 -odstotna relativna vlažnost
Negativna kontrola	50 μl H_2O preskušeno sočasno	50 μl H_2O preskušeno sočasno	30 $\pm 2\mu\text{l}$ DPBS brez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ preskušeno sočasno	30 $\pm 2\mu\text{l}$ DPBS brez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ preskušeno sočasno
Pozitivna kontrola	50 μl metilacetata preskušeno sočasno	50 μl metilacetata preskušeno sočasno	30 $\pm 2\mu\text{l}$ metilacetata preskušeno sočasno	30 $\pm 2\mu\text{l}$ metilacetata preskušeno sočasno

Elementi preskusa	EpiOcular™ EIT (VRM 1)	SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)
Raztopina MTT	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml	300 µl s koncentracijo 1 mg/ml
Inkubacija MTT in temperatura inkubacije MTT	180 min (± 15 min) pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 -odstotna relativna vlažnost	180 min (± 15 min) pri 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO ₂ , ≥ 95 -odstotna relativna vlažnost
Ekstrakcijsko topilo	2 ml izopropanola (ekstrakcija iz zgornjega in spodnjega dela vstavka s prebadanjem tkiva)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija iz spodnjega in spodnjega dela vstavka).
Čas in temperatura ekstrakcije	2–3 ure s stresanjem (~ 120 vrt./min) pri sobni temperaturi ali čez noč pri 4–10 °C	4 ure s stresanjem (~ 120 vrt./min) pri sobni temperaturi ali vsaj čez noč brez stresa pri 4–10 °C
Odčitek optične gostote	570 nm (550–590 nm) brez referenčnega filtra	570 nm (540–600 nm) brez referenčnega filtra
Kontrola kakovosti tkiva	tretiranje s 100 µl Tritona X-100 s koncentracijo 0,3 vol. % 12,2 min $\leq$ ET ₅₀ $\leq$ 37,5 min	30-minutno tretiranje s SDS (50 µl) 1,0 mg/ml $\leq$ IC ₅₀ $\leq$ 3,2 mg/ml

Elementi preskusa	EpiOcular™ EIT (VRM 1)	SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)
Merila za sprejemljivost	1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo, mora biti $> 0,8$ in $< 2,5$. 2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 30 minut izpostavljenih pozitivni kontroli, izražena kot delež negativne kontrole, mora biti < 50 %. 3. Razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv mora biti manjša od 20 %.	1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo, mora biti $> 1,0$ in $\leq 2,5$. 2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 30 minut izpostavljenih pozitivni kontroli, izražena kot delež negativne kontrole, mora biti ≤ 30 %. 3. Razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv mora biti manjša od 20 %.
		1. Srednja optična gostota ponovljenih vzorcev tkiv, tretiranih z negativno kontrolo, mora biti $> 1,0$ in $\leq 2,5$. 2. Srednja viabilnost ponovljenih vzorcev tkiv, 4 ure izpostavljenih pozitivni kontroli, izražena kot delež negativne kontrole, mora biti ≤ 20 %. 3. Razlika v viabilnosti med dvema ponovljenima vzorcema tkiv mora biti manjša od 20 %.

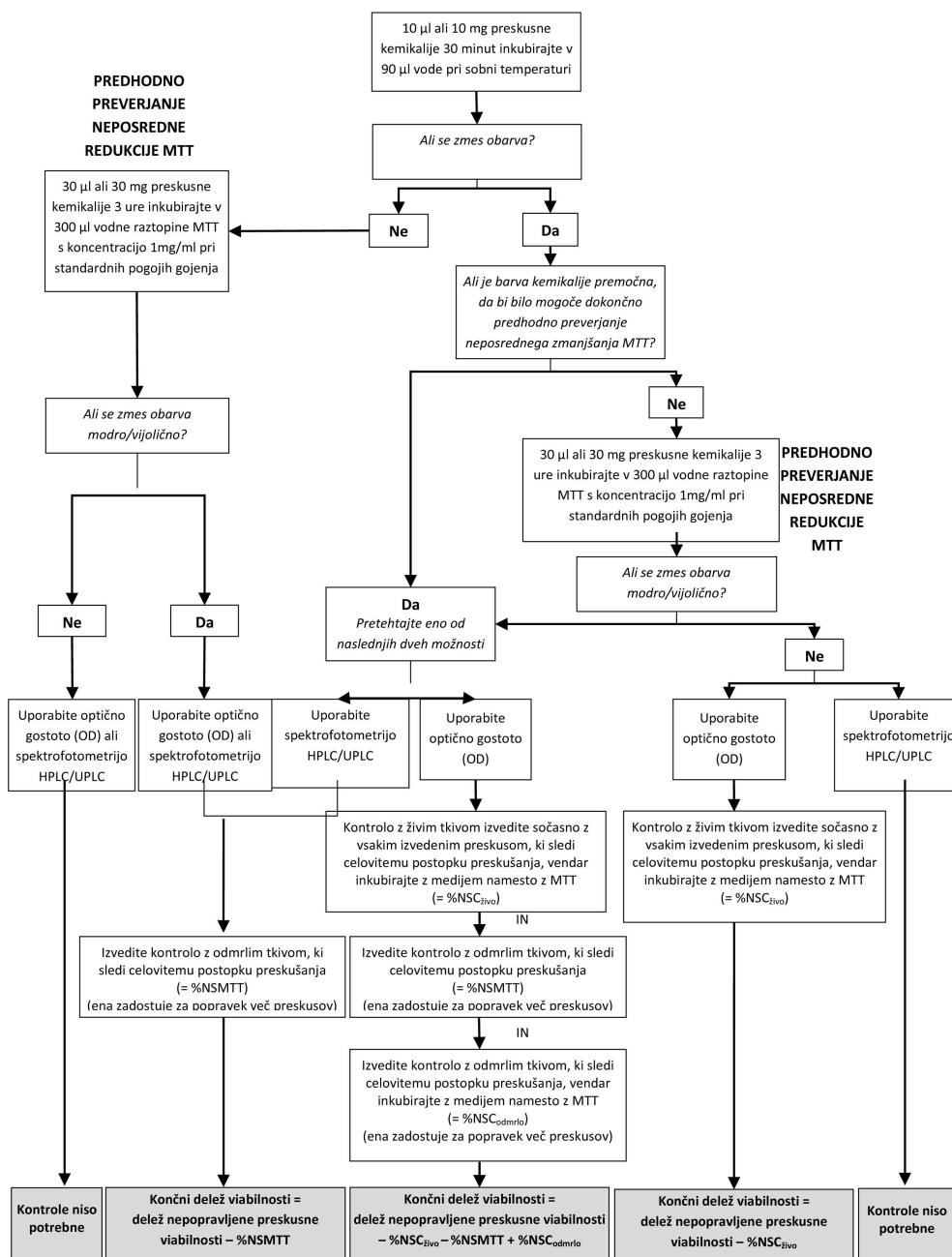
Dodatek 3

PONAZORITVENI SHEMATSKI PRIKAZ Z NAVODILI O TEM, KAKO OPREDELITI IN OBRAVNAVATI SNOVI, KI NEPOSREDNO ZMANJŠUJEJO MTT, IN/ALI KEMIKALIJE, KI POVZROČAJO BARVNO INTERFERENCO, NA PODLAGI STANDARDNEGA DELOVNEGA POSTOPKA ZA VRM1



Dodatek 4

PONAZORITVENI SHEMATSKI PRIKAZ Z NAVODILI O TEM, KAKO OPREDELITI IN OBRAVNAVATI SNOVI, KI NEPOSREDNO ZMANJŠUJEJO MTT, IN/ALI KEMIKALIJE, KI POVZROČAJO BARVNO INTERFERENCO, NA PODLAGI STANDARDNEGA DELOVNEGA POSTOPKA ZA VRM2



Dodatek 5

KLJUČNI PARAMETRI IN MERILA ZA SPREJEMLJIVOST ZA USTREZNOST SISTEMA SPEKTROFOTOMETRIJE HPLC/UPLC ZA MERJENJE FORMAZANA MTT, EKSTRAHIRANEGA IZ KONSTRUKCIJ TKIVA REKONSTRUIRANEGA EPITELIJA, PODOBNEGA ČLOVEŠKEMU ROŽENIČNEMU

Parameter	Protokol, izpeljan iz smernic FDA (36) (38)	Merila za sprejemljivost
Selektivnost	Analiza izopropanola, živega slepega vzorca (izvlečka izopropanola iz živih konstrukcij tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, brez kakršnega koli tretiranja), odmrlega slepega vzorca (izvlečka izopropanola iz odmrlih konstrukcij tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, brez kakršnega koli tretiranja) in barvila (npr. metilen modrega).	$Površina_{interferenca} \leq 20 \% površine_{LLOQ}^{(1)}$.
Natančnost	Kontrole kakovosti (tj. formazan MTT pri 1,6 µg/ml, 16 µg/ml in 160 µg/ml) v izopropanolu (n = 5).	$KV \leq 15 \% \text{ ali } \leq 20 \% \text{ za LLOQ}$.
Točnost	Kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	$\% Dev \leq 15 \% \text{ ali } \leq 20 \% \text{ za LLOQ}$.
Vpliv matriksa	Kontrole kakovosti v živem slepem vzorcu (n = 5).	$85 \% \leq \% \text{ vpliva matriksa } \leq 115 \%$
Prenos	Analiza izopropanola po standardu ULOQ ⁽²⁾ .	$Površina_{interferenca} \leq 20 \% površine_{LLOQ}$.
Obnovljivost (znotraj dneva)	3 neodvisne umeritvene krivulje (na podlagi 6 zaporednih tretjinskih razredčin formazana MTT v izopropanolu, ki se začnejo pri ULOQ, tj. 200 µg/ml); kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 5).	Umeritvene krivulje: $\% Dev \leq 15 \% \text{ ali } \leq 20 \% \text{ za LLOQ}$. Kontrole kakovosti: $\% Dev \leq 15 \% \text{ in } KV \leq 15 \%$.
Obnovljivost (med dnevi)	1. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 2. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3). 3. dan: 1 umeritvena krivulja in kontrole kakovosti v izopropanolu (n = 3).	
Kratkoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po 24 urah hrambe pri sobni temperaturi.	$\% Dev \leq 15 \%$.
Dolgoročna stabilnost formazana MTT v izvlečku tkiva rekonstruiranega epitelijskega, podobnega človeškemu roženičnemu, če je potrebno	Kontrole kakovosti v živih slepih vzorcih (n = 3), analiziranih na dan priprave in po več dneh hrambe pri -20 °C.	$\% Dev \leq 15 \%$.

⁽¹⁾ LLOQ: spodnja meja določljivosti (Lower Limit of Quantification), opredeljena tako, da zajema 1–2-odstotno viabilnost tkiva, tj. 0,8 µg/ml.

⁽²⁾ ULOQ: zgornja meja določljivosti (Upper Limit of Quantification), opredeljena tako, da je vsaj dvakrat višja od najvišje pričakovane koncentracije formazana MTT v izvlečkih izopropanola iz negativnih kontrol (~ 70 µg/ml v VRM), tj. 200 µg/ml.

B.70 IN VITROPRESKUSI S ČLOVEŠKIMI REKOMBINANTNIMI ESTROGENSKIMI RECEPTORJI (hrER) ZA ZAZNAVO KEMIKAJIJ Z VEZAVNO AFINITETO ZA ER**SPLOŠNI UVOD****Smernica OECD za preskušanje na podlagi učinkovitosti**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 493 (2015). Smernica za preskušanje 493 je smernica za preskušanje, ki temelji na učinkovitosti, opisuje pa metodologijo za *in vitro* preskuse s človeškimi rekombinantnimi receptorji za zaznavo snovi z afiniteto za vezavo na estrogenske receptorje (v nadaljnjem besedilu: preskusi vezave na hrER). Vključuje dva mehanistično in funkcionalno podobna preskusa za opredelitev snovi, ki se vežejo na estrogenske receptorje (tj. ER α), ter naj bi olajšala razvoj novih podobnih ali prilagojenih preskusov v skladu z načeli za validacijo, določenimi v Smernici OECD za validacijo in mednarodno priznanje novih ali posodobljenih preskusnih metod za oceno tveganj (1). Popolnoma validirani referenčni preskusni metodi (Dodatek 2 in Dodatek 3), ki sta podlaga za to smernico za preskušanje na podlagi učinkovitosti, sta:

— Freyberger-Wilsonov (FW) preskus vezave na estrogenske receptorje (ER) *in vitro*, pri katerem se uporablja celotni človeški rekombinantni ER α (2), ter

— preskus vezave na estrogenske receptorje *in vitro* z uporabo rekombinantnega človeškega proteina z domeno za vezavo ligandov inštituta CERI (Chemical Evaluation and Research Institute) (2).

Na voljo so standardi izvajanja (3), da se olajšata razvoj in validacija podobnih preskusnih metod za isto končno točko nevarnosti ter omogoči pravočasna sprememba na učinkovitosti temelječe Smernice za preskušanje 493, tako da se lahko posodobljeni smernici za preskušanje, ki temelji na učinkovitosti, dodajo novi podobni preskusi. Vendar bodo podobni preskusi dodani šele, ko jih bo OECD pregledala in potrdila, da so v skladu s standardi izvajanja. Preskusi, vključeni v Smernico za preskušanje 493, se lahko brez razlik uporabljajo za obravnavanje zahtev držav članic OECD po rezultatih preskusov v zvezi z vezavo na estrogenske receptorje, hkrati pa se izkoristi medsebojno priznavanje podatkov OECD.

Ozadje in načela preskusov, vključenih v to preskusno metodo

2. OECD se je leta 1998 začela ukvarjati s prednostno nalogo revidiranja obstoječih smernic za preskušanje ter priprave novih smernic za presejalne preskuse in preskušanje kemikalij, ki bi lahko povzročale endokrine motnje. Temeljni okvir OECD za preskušanje in ocenjevanje kemikalij, ki bi lahko povzročale endokrine motnje, je bil revidiran leta 2012. Prvotni in revidirani temeljni okvir sta kot prilogi vključena v Smernice za standardizirane smernice za preskušanje za ocenjevanje kemikalij glede lastnosti endokrinih motilcev (4). Temeljni okvir zajema pet ravni, pri čemer vsaka raven ustreza posamezni stopnji biološke kompleksnosti. Preskusi vezave na estrogenske receptorje, opisani v tej preskusni metodi, so raven 2, ki vključuje „preskuse *in vitro*, ki zagotavljajo podatke o izbranih endokrinih mehanizmih/poteh“. Ta preskusna metoda je za *in vitro* preskuse vezave na receptorje, s katerimi se opredelijo ligandi za človeški estrogenski receptor alfa (ER α).
3. Ustreznost *in vitro* preskusa vezave na ER za biološke funkcije je bila jasno dokazana. Preskusi vezave na ER so zasnovani, da se opredelijo kemikalije, ki bi lahko zmotile pot hormona estrogena, pri čemer so se v zadnjih dveh desetletjih obširno uporabljali za opredelitev porazdelitve ER v tkivih ter opredelitev agonistov/antagonistov ER. V teh preskusih se kaže interakcija ligand-receptor, ki je začetna faza estrogenske signalne poti in nujna za razmnoževalno funkcijo pri vseh vretenčarjih.

4. Interakcija med estrogeni in ER lahko vpliva na transkripcijo genov, ki jih nadzoruje estrogen, in povzroči nege-nomske učinke, kar lahko povzroči indukcijo ali inhibicijo celičnih procesov, vključno s tistimi, ki so nujni za celično proliferacijo, normalen razvoj zarodka in razmnoževalno funkcijo (5) (6) (7). Motnja normalnih estrogenskih sistemov ima lahko škodljive učinke na normalen razvoj (ontogenezo), reproduktivno zdravje in celovitost razmno-ževalnega sistema. Nepravilno signaliziranje ER ima lahko učinke, kot so povečano tveganje za hormonsko odvisnega raka, zmanjšana plodnost ter spremembe v rasti in razvoju ploda (8).
5. Preskusi vezave *in vitro* temeljijo na neposredni interakciji snovi s specifičnim vezavnim mestom za ligande na receptorju, ki uravnava gensko transkripcijo. Ključni element preskusa s človeškim rekombinantnim estrogenskim receptorjem alfa (hER α) meri zmožnost radioaktivno označenega liganda ([3 H]17 β -estradiol), da se veže na ER ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije (tj. kompetitorja). Preskusne kemikalije, ki imajo visoko afiniteto do ER, tekmujejo z radioaktivno označenim ligandom pri nižji koncentraciji kot kemikalije z nižjo afiniteto do receptorja. Ta preskus je sestavljen iz dveh večjih delov: poskusa vezave z nasičenjem za opredelitev parametrov interakcije receptor-ligand ter dokumentiranja specifičnosti ER, ki mu sledi poskus kompetitivne vezave, za katerega je značilno tekmovalje med preskusno kemikalijo in radioaktivno označenim ligandom za vezavo na ER.
6. Z validacijskimi študijami preskusov vezave inštituta CERI in FW sta bili dokazani njuna ustreznost in zanesljivost za predvideni namen (2).
7. Opredelitve pojmov in kratice, uporabljene pri tej preskusni metodi, so opisane v Dodatku 1.

Obseg in omejitve preskusov vezave na receptorje

8. Ti preskusi so predlagani za namene presejanja in prednostnega razvrščanja, lahko pa zagotovijo tudi podatke za molekularni sprožitveni dogodek, ki se lahko uporabijo pri pristopu, ki temelji na zanesljivosti dokazov. Z njimi se obravnava vezava kemikalije na domeno za vezavo liganda na ER α v sistemu *in vitro*. Tako se rezultati ne smejo neposredno ekstrapolirati na kompleksno signaliziranje in uravnavanje nedotaknjene endokrinega sistema *in vivo*.
9. Vezava naravnega liganda, 17 β -estradiola, je prva faza v nizu molekularnih dogodkov, ki sproži transkripcijo tarčnih genov in nazadnje doseže vrh s fiziološko spremembo (9). Tako se vezava na domeno za vezavo liganda na ER α šteje za enega od ključnih mehanizmov z ER povzročenih motenj endokrinega sistema, čeprav obstajajo še drugi mehan-izmi, prek katerih lahko pride do takih motenj, vključno z (i) interakcijami z drugimi mesti ER α , ki niso žep za vezavo liganda, (ii) interakcijami z drugimi receptorji, pomembnimi za estrogensko signaliziranje, ER β in estrogen-skim receptorjem, sklopljenim s proteinom G, drugimi receptorji in encimskimi sistemi znotraj endokrinega sistema, (iii) sintezo hormonov, (iv) presnovno aktivacijo in/ali inaktivacijo hormonov, (v) porazdelitvijo hormonov v ciljna tkiva in (vi) očiščkom hormonov iz telesa. Ti načini delovanja se ne obravnavajo z nobenim od preskusov v okviru te preskusne metode.

10. S to preskusno metodo se obravnava zmožnost snovi, da se vežejo na človeški ER α , in ne razlikuje med agonisti ali antagonisti ER α . Prav tako se s temi preskusi ne obravnavajo niti nadaljnji sledeči dogodki, kot so genska transkripcija ali fiziološke spremembe. Glede na to, da so bile med validacijo uporabljene samo posamezne snovi iz ene sestavine, uporaba za preskušanje zmesi ni bila obravnavana. Ne glede na to so preskusi teoretično ustrezni za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi. Preden se preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni.
11. Brezcelični receptorski sistemi nimajo endogene presnovne zmogljivosti in niso bili validirani v povezavi z encimskimi presnovnimi sistemi. Kljub temu bi bilo mogoče presnovno aktivnost vključiti v zasnovo študije, vendar bi bilo za to potrebno dodatno validacijsko delo.
12. Kemikalije, ki lahko denaturirajo protein (tj. receptorski protein), kot so površinsko aktivne snovi, ali kemikalije, ki lahko spremenijo pH analiznega pufra, se ne smejo preskušati oziroma se lahko preskušajo samo pri koncentracijah, ki ne povzročajo takih interakcij. Sicer pa je območje koncentracije, ki se lahko preskusi pri preskusih s preskusno kemikalijo, omejeno z njeno topnostjo v analiznem pufu.
13. Informativno so v preglednici 1 navedeni rezultati preskusov za 24 snovi, ki so bile preskušene v obeh v celoti validiranih preskusih, opisanih v tej preskusni metodi. Od teh snovi jih je na podlagi objavljenih poročil, vključno s preskusi *in vitro* za transkripcijsko aktivacijo ER in/ali uterotropni preskus (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15), 17 razvrščenih med snovi, ki se vežejo na ER, 6 pa med snovi, ki se ne vežejo. V zvezi s podatki, povzetimi v preglednici 1, je obstajalo skoraj 100-odstotno ujemanje med obema preskusoma v zvezi z razvrščanjem vseh snovi do 10^{-4} M, vse snovi pa so bile pravilno razvrščene med snovi, ki se vežejo na ER, ali snovi, ki se ne vežejo. Dodatne informacije o tej skupini snovi in dodatnih snoveh, preskušanih v preskusih vezave na ER med validacijskimi študijami, so na voljo v standardih izvajanja za preskus vezave s človeškim rekombinantnim endogenim receptorjem (3), Dodatek 2 (preglednice 1, 2 in 3).

Preglednica 1

Razvrstitev snovi med snovi, ki se vežejo na ER, ali snovi, ki se ne vežejo, pri preskusih vezave s človeškim rekombinantnim endogenim receptorjem FW in CERi skupaj s primerjavo s pričakovanim odzivom

	Ime snovi	Št. CAS	Pričakovani odziv	Preskus FW		Preskus CERi		Kemijski razred po MESH	Skupina proizvodov
				Območje koncentracije (M)	Razvrstitev	Območje koncentracije (M)	Razvrstitev		
1	17β-Estradiol	50-28-2	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	snov, ki se veže	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
2	Noretinodrel	68-23-5	snov, ki se veže	od 3×10^{-9} do 30×10^{-4}	snov, ki se veže	od 3×10^{-9} do 30×10^{-4}	snov, ki se veže	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
3	Noretindron	68-22-4	snov, ki se veže	od 3×10^{-9} do 30×10^{-4}	snov, ki se veže	od 3×10^{-9} do 30×10^{-4}	snov, ki se veže	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
4	Di-n-butil ftalat	84-74-2	snov, ki se ne veže (*)	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže (**) (†)	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže (**) (†)	ogljikovodik (ciklični), ester	mehčalo, kemijski vmesni produkt
5	DES	56-53-1	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	ogljikovodik (ciklični), fenol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
6	17α-etinilestradiol	57-63-6	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
7	Mezo-heksestrol	84-16-2	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	ogljikovodik (ciklični), fenol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
8	Genistein	446-72-0	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	ogljikovodik (heterociklični), flavonoid	naravni produkt
9	Ekvol	531-95-3	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	fitoestrogenski metabolit	naravni produkt
10	Butil paraben (n-butil-4-hidroksi-benzoat)	94-26-8	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	paraben	konzervans

	Ime snovi	Št. CAS	Pričakovani odziv	Preskus FW		Preskus CERI		Kemijski razred po MESH	Skupina proizvodov
				Območje koncentracije (M)	Razvrstitev	Območje koncentracije (M)	Razvrstitev		
11	Nonilfenol (zmes)	84852-15-3	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	alkilfenol	vmesna spojina
12	op'-DDT	789-02-6	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	organoklorin	insekticid
13	Kortikosteron	50-22-6	snov, ki se ne veže (*)	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže	steroid	naravni produkt
14	Zearalenon	17924-92-4	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	ogljikovodik (heterociklični), lakton	naravni produkt
15	Tamoksifen	10540-29-1	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
16	5 α -dihidrotestosteron	521-18-6	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	steroid, nefenolni	naravni produkt
17	Bisfenol A	80-05-7	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	fenol	kemijski vmesni produkt
18	4-n-heptilfenol	1987-50-4	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	dvoumno ^(a)	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	alkilfenol	vmesni produkt
19	Kepon (klordekon)	143-50-0	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	ogljikovodik (halogenirani)	pesticid
20	Benz(a)antracen	56-55-3	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se ne veže ^(b)	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se ne veže ^(b)	aromatski ogljikovodik	vmesni produkt
21	Enterolakton	78473-71-9	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se veže	fitosterogen	naravni produkt
22	Progesteron	57-83-0	snov, ki se ne veže (*)	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže	steroid	naravni produkt

	Ime snovi	Št. CAS	Pričakovani odziv	Preskus FW		Preskus CERl		Kemijski razred po MESH	Skupina proizvodov
				Območje koncentracije (M)	Razvrstitev	Območje koncentracije (M)	Razvrstitev		
23	Oktiltrietskisilan	2943-75-1	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	snov, ki se ne veže	silan	površinski modifikator
24	Atrazin	1912-24-9	snov, ki se ne veže (*)	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	snov, ki se ne veže	heterociklična spojina	herbicid

(*) Meja topnosti $< 1 \times 10^{-4}$ M.

(**) Uporaba in razvrstitev di-n-butil fralata (DBP) kot snovi, ki se ne veže, sta temeljili na preskušanju do 10^{-4} M, ker je bilo med predvalidacijskimi študijami v nekaterih laboratorijih ugotovljeno, da snov ni topna pri 10^{-3} M (npr. mornost).

(†) Med validacijsko študijo je bil di-n-butil fralat (DBP) preskušan kot šifrirana preskusna snov s koncentracijami do 10^{-3} M. V teh pogojih so nekateri laboratoriji opazili zmanjšanje vezave radioaktivno označenih ligandov pri najvišji koncentraciji (10^{-3} M) in/ali dvoumno prileganje krivulje. Za te ponovitve je bil DBP razvrščen kot 'dvoumen' ali 'snov, ki se veže' v 3/5 laboratorijev, ki so uporabili preskus CERl, in 5/6 laboratorijev, ki so uporabili preskus FW (glej vir (2), oddelka IV.B.3a,b in VI.A).

(‡) Razvrstitev se ni ujemala s pričakovano razvrstitvijo. Zaradi razvrstitve 4-n-heptilfenola kot 'dvoumnega' ali 'snovi, ki se ne veže', v 3/5 laboratorijev je bila povprečna razvrstitev med dvoumne snovi. Natančnejši pregled je razkril, da je bilo to posledica omejitve topnosti kemikalije, zaradi katerih ni bilo mogoče dobiti popolne krivulje vezave.

(§) Med validacijsko študijo je bil benz(a)antracen razvrščen kot snov, ki se ne veže (tj. negativna), in sicer na podlagi objavljenih virov, ki dokazujejo, da je estrogeno delovanje te snovi *in vitro* (16) predvsem odvisno od njene presnovne aktivacije(17)(18). Encimska presnovna aktivacija snovi ne bi bila pričakovana v brezceličnih preskusih vezave s človeškim rekombinantnim estrogenim receptorjem, kot so bili uporabljeni v tej validacijski študiji med laboratoriji. Tako je pravilna razvrstitev te snovi med 'snovi, ki se ne vežejo', če se uporablja v preskusnih pogojih za preskusa FW in CERl.

ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE S ČLOVEŠKIM REKOMBINANTNIM ESTROGENSKIM RECEPTORJEM (HRER)

Nujni elementi preskusa

14. Ta preskusna metoda se uporablja za preskuse, pri katerih se uporabljata receptor ER in primerno močan ligand na receptorju, ki se lahko uporabi kot označevalec/sledilo za preskus in se lahko premešča z naraščanjem koncentracij preskusne kemikalije. Preskusi vezave vsebujejo naslednja glavna elementa: (1) vezavo z nasičenjem in (2) kompetitivno vezavo. Preskus vezave z nasičenjem se uporablja za potrditev specifičnosti in aktivnosti receptorskih pripravkov, medtem ko se poskus s kompetitivno vezavo uporablja za oceno zmožnosti preskusne kemikalije, da se veže na človeški rekombinantni estrogenski receptor.

Kontrole

15. Opisati je treba podlago za predlagani sočasni referenčni estrogen in kontrole. Sočasne kontrole (topilo (vehikel), pozitivna (snov, ki se veže na ER; močna in šibka afiniteta), negativna (snov, ki se ne veže), kakor je ustrezno, se uporabljajo kot kazalnik, da preskus deluje v preskusnih pogojih, in zagotavljajo podlago za primerjave med poskusi; običajno spadajo med merila za sprejemljivost posameznega poskusa (1). Na eni plošči je treba med vsako ponovitvijo uporabiti celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole (tj. snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Vse druge plošče morajo vsebovati: (1) visoko (približno polna premestitev radioaktivno označenega liganda) in srednjo (približno IC_{50}) koncentracijo vsakega od E2 in snovi, ki se veže šibko, v treh ponovitvah; (2) kontrolo s topilom in nespecifično vezavo, vsako v treh ponovitvah.

Standardni postopki kontrole kakovosti

16. Standardne postopke kontrole kakovosti je treba izvesti, kot je opisano za vsak preskus, za zagotovitev, da aktivni receptorji, pravilne koncentracije kemikalij, meje dovoljenega odstopanja ostanejo stabilni skozi več ponovitev in ohranijo sposobnost za zagotovitev pričakovanih odzivov vezave na ER v daljšem časovnem obdobju.

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija

17. Pred preskušanjem neznanih kemikalij s katerim od preskusov v okviru te preskusne metode mora vsak laboratorij dokazati usposobljenost za uporabo preskusa, tako da izvede preskuse z nasičenjem, da se potrdita specifičnost in aktivnost pripravka ER, in preskuse s kompetitivno vezavo z referenčnim estrogenom in kontrolami (snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Laboratorij mora vzpostaviti zbirko podatkov iz preteklih preskusov z rezultati za referenčni estrogen in kontrole, dobljenimi na podlagi 3–5 neodvisnih poskusov, izvedenih na različne dneve. Ti poskusi bodo za laboratorij podlaga za referenčni estrogen in kontrole iz preteklih preskusov ter bodo uporabljeni kot delna ocena sprejemljivosti preskusa za prihodnje ponovitve.
18. Odzivnost preskusnega sistema bo prav tako potrjena s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v preglednici 2. Seznam snovi za preverjanje usposobljenosti je podskupina referenčnih snovi, navedenih v standardih izvajanja za preskuse vezave na ER (3). Te snovi so na voljo na trgu, predstavljajo razrede kemikalij, ki se pogosto povezujejo z delovanjem vezave na ER, ter imajo primeren razpon jakosti, ki se pričakuje za snovi, ki se vežejo na ER (tj. močne do šibke), in snovi, ki se ne vežejo (tj. negativne snovi). Za vsako snov za preverjanje usposobljenosti morajo preskušene koncentracije zajemati razpon, naveden v preglednici 2. Za vsako snov je treba izvesti vsaj tri poskuse, rezultati pa morajo biti skladni s pričakovanim kemijskim delovanjem. Vsak poskus je treba izvesti neodvisno (tj. s svežimi razredčinami receptorja, kemikalij in reagenta) in s tremi ponovljenimi vzorci za vsako koncentracijo. Usposobljenost se dokaže s pravilno razvrstitvijo (pozitivna/negativna) vsake snovi za preverjanje usposobljenosti. Preverjanje usposobljenosti mora izvesti vsak tehnik, ko se uči preskusov.

Preglednica 2

Seznam kontrol in snovi za preverjanje usposobljenosti za preskuse kompetitivne vezave na človeški rekombinantni estrogenski receptor ⁽¹⁾

Št.	Ime snovi	Št. CAS ⁽²⁾	Pričakovani odziv ⁽³⁾ ⁽⁴⁾	Območje preskusnih koncentracij (M)	Kemijski razred po MeSH ⁽⁵⁾	Skupina proizvodov ⁽⁶⁾
Kontrole (referenčni estrogen, snov, ki se veže šibko, snov, ki se ne veže)						
1	17-εσtρaδιol	50-28-2	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
2	Noretinodrel (ali) noretindron	68-23-5 (ali) 68-22-4	snov, ki se veže	od 3×10^{-9} do 30×10^{-6}	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
3	Oktitrietoksisilan	2943-75-1	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	silan	povišinski modifikator
Snovi za preverjanje usposobljenosti ⁽⁶⁾						
4	Dietilstilbestrol	56-53-1	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	ogljikovodik (ciklični), fenol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
5	17α-etinilestradiol	57-63-6	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	steroid	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
6	Mezo-heksestrol	84-16-2	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	ogljikovodik (ciklični), fenol	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
7	Tamoksifen	10540-29-1	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	ogljikovodik (ciklični)	farmacevtsko sredstvo za uporabo v veterinarski medicini
8	Genistein	446-72-0	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	heterociklična spojina, flavonoid	naravni produkt

Št.	Ime snovi	Št. CAS ⁽²⁾	Pričakovani odziv ⁽³⁾ ⁽⁴⁾	Območje preskusnih koncentracij (M)	Kemijski razred po MeSH ⁽⁵⁾	Skupina proizvodov ⁽⁶⁾
9	Bisfenol A	80-05-7	snov, ki se veže	od 1×10^{-10} do 1×10^{-3}	fenol	kemijski vmesni produkt
10	Zearalenon	17924-92-4	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-3}	heterociklična spojina, lakton	naravni produkt
11	Butil paraben	94-26-8	snov, ki se veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-3}	karboksilna kislina, fenol	konzervans
12	Atrazin	1912-24-9	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-6}	heterociklična spojina	herbicid
13	Di-n-butilftalat (DBP) ⁽⁷⁾	84-74-2	snov, ki se ne veže ⁽⁸⁾	od 1×10^{-10} do 1×10^{-4}	ogljikovodik (ciklični), ester	mehčalo, kemijski vmesni produkt
14	Kortikosteron	50-22-6	snov, ki se ne veže	od 1×10^{-11} do 1×10^{-4}	steroid	naravni produkt

⁽¹⁾ Če snov za preverjanje usposobljenosti ni več na voljo na trgu, se lahko uporabi snov z enako razvrstitvijo vezave na ER, primerljivo jakostjo in kemijskim razredom.

⁽²⁾ Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvečkov (CAS).

⁽³⁾ Razvrstitev kot snov, ki se veže na ER, ali snov, ki se ne veže, med validacijsko študijo za preskusa vezave na človeški rekombinantni estrogenski receptor CER1 in FW (2).

⁽⁴⁾ Aktivnost vezave na ER je temeljila na dokumentu ICCVAM o pregledu ozadja preskusov vezave na ER in TA (9) ter na empiričnih podatkih in drugih informacijah, pridobljenih iz referenčnih študij, ki so bile objavljene in pregledane (10) (11) (12) (13) (14) (15).

⁽⁵⁾ Snovi so bile razvrščene v enega ali več kemijskih razredov z uporabo mednarodno priznanega standardiziranega sistema za razvrščanje, U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) (na voljo na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽⁶⁾ Snovi so bile razvrščene v enega ali več razredov produktov z uporabo U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (na voljo na <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

⁽⁷⁾ DBP se lahko uporabi kot nadomestna kontrolna snov, ki se ne veže, preiskšana pri najvišji koncentraciji 10^{-4} M.

⁽⁸⁾ Meja topnosti za to snov je 10^{-4} M. Uporaba in razvrstitev di-n-butil ftalata (DBP) kot snovi, ki se ne veže, sta temeljili na preskušanju do 10^{-4} M, ker je bilo med predvalidacijskimi študijami v nekaterih laboratorijih ugotovljeno, da snov ni topna pri 10^{-3} M (npr. motnost).

Preskušanje topnosti in določanje območja koncentracije za preskusne kemikalije

19. Izvesti je treba predhodni preskus za določitev meje topnosti za vsako preskusno kemikalijo in za opredelitev ustreznega območja koncentracije, ki se uporabi pri izvajanju preskusa. Mejo topnosti vsake preskusne kemikalije je treba najprej določiti v topilu in nato dodatno potrditi v pogojih preskusa. Končna koncentracija, preskušena v preskusu, ne sme presegati 1 mM. Preskušanje za določanje območja sestavljajo kontrola s topilom in osem logaritmskih zaporednih razredčin, ki se začnejo pri najvišji dopustni koncentraciji (npr. 1 mM ali manj, odvisno od meje topnosti), ter evidentiranje morebitne motnosti ali oborine. Koncentracije pri drugem in tretjem poskusu je treba ustrezno prilagoditi, da se bolje izrazi krivulja odziva na koncentracijo.

Merila za sprejemljivost ponovitve preskusa

20. Sprejetje ali zavrnitev ponovitve preskusa temelji na oceni rezultatov, dobljenih za referenčni estrogen in kontrolo, uporabljeno za posamezni poskus. Najprej, za prvo ploščo morajo celotne krivulje koncentracije za referenčne kontrole iz vsakega poskusa ustrezati meritvam učinkovitosti s parametri prileganja krivulje (npr. IC_{50} in Hillov naklon) na podlagi rezultatov, sporočenih za zadevne protokole pri preskusih CERI in FW (dodatka 2 in 3), in podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov laboratorija, ki izvaja preskus. Vse kontrole (referenčni estrogen, snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže) morajo biti za vsak poskus ustrezno razvrščene. Dalje, kontrole na vseh naslednjih ploščah je treba oceniti glede skladnosti s prvo ploščo. Uporabiti je treba dovolj veliko območje koncentracij preskusne kemikalije, da se jasno opredeli vrh krivulje kompetitivne vezave. Variabilnost med ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije in med tremi neodvisnimi ponovitvami mora biti mogoče razumno in znanstveno utemeljiti. Sposobnost doslednega izvajanja preskusa je treba dokazati z vzpostavitvijo in vzdrževanjem zbirke podatkov iz preteklih preskusov za referenčni estrogen in kontrole. Standardni odkloni ali koeficienti variacije za srednje vrednosti parametrov prileganja krivulj vezave na referenčni estrogen in kontrol s snovmi, ki se šibko vežejo, iz več poskusov se lahko uporabijo kot merilo za obnovljivost znotraj laboratorija. Pri pregledu rezultatov kontrole plošč iz vsake ponovitve in za vsako preskusno kemikalijo je treba uporabiti strokovno presojo.

Poleg tega je treba upoštevati naslednja načela v zvezi z merili za sprejemljivost:

- Podatki morajo zadostovati za kvantitativno oceno vezave na ER.
- Preskušene koncentracije morajo ostati znotraj razpona topnosti preskusne kemikalije.

Analiza podatkov

21. Opredeljeni postopek podatkovne analize za podatke o vezavi z nasičenjem in kompetitivni vezavi mora biti v skladu s ključnimi načeli za opredelitev interakcij receptor-ligand. Običajno se podatki o vezavi z nasičenjem analizirajo z uporabo modela nelinearne regresije, ki upošteva skupno in nespecifično vezavo. Pri določanju B_{max} in K_d je morda potreben popravek zaradi izgube liganda (npr. Swillens, 1995 (19)). Podatki iz preskusov kompetitivne vezave se običajno pretvorijo (npr. delež specifične vezave in koncentracija preskusne kemikalije ($\log M$)). Ocene logaritma (IC_{50}) za vsako preskusno kemikalijo je treba določiti z uporabo ustrezne programske opreme za nelinearno prileganje krivulj, da ustreza štiriparametrski Hillovi enačbi. Po začetni analizi je treba izpeljati parametre prileganja krivulj in vizualni pregled, kako dobro se podatki o vezavi prilegajo dobljeni krivulji kompetitivne vezave. V nekaterih primerih je za najboljše prileganje krivulje morda potrebna dodatna analiza (npr. z omejitvijo vrha in dna krivulje, uporabo pravila 10 %, glej Dodatek 4 in sklic 2 (oddelek III.A.2)).
22. Izpolnjevanje meril za sprejemljivost (odstavek 20) kaže, da preskusni sistem deluje pravilno, vendar ne zagotavlja, da bodo pri posameznem preskusu dobljeni točni podatki. Najboljši znak, da so bili dobljeni točni podatki, je podvojitvev pravih rezultatov prvega preskusa.

Splošna merila za razlago rezultatov

23. Trenutno ni splošno sprejete metode za razlago podatkov o vezavi na ER. Kljub temu morata kvalitativna (npr. snov, ki se veže/snov, ki se ne veže) in/ali kvantitativna (npr. log IC₅₀, relativna vezavna afiniteta (RBA) itd.) ocena s človeškim rekombinantnim estrogenskim receptorjem povzročene dejavnosti temeljiti na empiričnih podatkih in razumni znanstveni presoji.

Poročilo o preskusu

24. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskus:

- uporabljeni preskus.

Kontrolna/referenčna/preskusna kemikalija:

- vir, številka serije, rok uporabe, če je na voljo;
- stabilnost preskusne kemikalije, če je znana;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu, če sta znani;
- meritve vrednosti pH, osmolarnosti in oborine v gojišču, ki mu je bila dodana preskusna kemikalija, če je ustrezno.

Snov iz ene sestavine:

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti;
- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Topilo/vehikel:

- opredelitev lastnosti (narava, dobavitelj in serija);
- utemeljitev izbire topila/vehikla;
- topnost in stabilnost preskusne kemikalije v topilu/vehiklu, če je znana.

Receptorji:

- vir receptorjev (dobavitelj, kataloška št., serija, vrsta receptorja, koncentracija aktivnega receptorja, ki jo zagotavlja dobavitelj, potrdilo dobavitelja);

- opredelitev lastnosti receptorjev (vključno z rezultati vezave z nasičenjem): K_d , B_{max} ;
- hramba receptorjev;
- radioaktivno označen ligand;
- dobavitelj, kataloška št., serija, specifično delovanje.

Preskusni pogoji:

- omejitve topnosti v pogojih preskusa;
- sestava vezavnega pufra;
- koncentracija receptorja;
- koncentracija sledila (tj. radioaktivno označenega liganda);
- koncentracije preskusne kemikalije;
- delež vehikla v končnem preskusu;
- inkubacijska temperatura in čas trajanja inkubacije;
- metoda vezanega/prostega ločevanja;
- pozitivne in negativne kontrole/referenčne snovi;
- merila za določitev, ali je preskus pozitiven, negativen ali dvoumen.

Preverjanje sprejemljivosti:

- dejanske vrednosti IC_{50} in Hillovega naklona za sočasne pozitivne kontrole/referenčne snovi.

Rezultati:

- neobdelani in vezani/prosti podatki;
- preverjanje za potrditev denaturacije, če je ustrezno;
- najnižja efektivna koncentracija, če obstaja;
- vrednosti relativne vezavne afinitete in/ali IC_{50} , kot je ustrezno;
- razmerje med koncentracijo in odzivom, kadar je mogoče;
- statistične analize, če obstajajo, skupaj z meritvijo napake in zaupanja (npr. SEM, SD, CV ali 95 % CI) ter opisom, kako so bile te vrednosti dobljene.

Razprava o rezultatih:

— uporaba pravila 10 %.

Sklepna ugotovitev

VIRI

- (1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 34), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 226), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 222), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (5) Cavaillès, V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, *Climacteric*, 5 Suppl 2: str. 20–6.
- (6) Welboren, W. J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer.*, 16(4): str. 1073–89.
- (7) Younes, M., in Honma, N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): str. 63–6.
- (8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, *Endo Rev* 30(4): 293-342.
- (9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (publikacija NIH št. 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- (10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (12) Akahori, Y., *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225–231.

-
- (13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 67), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. str. 1–188.
- (15) Yamasaki, K., Noda, S., Imatanaka, N., Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, *Toxicol. Letters*, 146: 111–120.
- (16) Kummer, V., Maskova, J., Zraly, Z., Neca, J., Simeckova, P., Vondracek, J., Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Letters*, 180: 213–221.
- (17) Gozgit, J. M., Nestor, K. M., Fasco, M. J., Pentecost, B. T., Arcaro, K. F. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58–67.
- (18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34: 835–848.
- (19) Swillens, S. (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6): 1197–1203.

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV IN OKRAJŠAVE

Pravilo 10 %: možnost, da se iz analiz izključijo podatkovne točke, pri katerih je srednja vrednost ponovljenih vzorcev za delež specifične vezave [^3H]17 β -estradiola najmanj 10 % nad opaženim deležem srednje vrednosti pri nižji koncentraciji (glej Dodatek 4).

Merila za sprejemljivost: minimalni standardi za učinkovitost poskusnih kontrol in referenčnih standardov. Da se poskus šteje za veljaven, morajo biti izpolnjena vsa merila za sprejemljivost.

Točnost (skladnost): stopnja ujemanja rezultatov preskusa s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusa in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz 'skladnost' se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravih rezultatov preskusa (1).

TO: temeljni okvir OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev.

Kemikalija: snov ali zmes.

KV: koeficient variacije.

E2: 17 β -estradiol

ED: endokrina motnja.

hER α : človeški estrogenski receptor alfa.

ER: estrogenski receptor.

Estrogenska aktivnost: zmožnost kemikalije, da posnema 17 β -estradiol, kar zadeva njegovo sposobnost vezave na estrogenske receptorje. Vezavo na hER α je mogoče zaznati s to preskusno metodo.

IC50: srednja efektivna koncentracija inhibitorne preskusne snovi.

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (medagencijski koordinacijski odbor ZDA za validacijo alternativnih metod).

Obnovljivost med laboratoriji: merilo, v kakšnem obsegu lahko različni usposobljeni laboratoriji z uporabo istega protokola in preskušanjem istih snovi dobijo kvalitativno in kvantitativno podobne rezultate. Obnovljivost med laboratoriji se ugotovi med postopki pred validacijo in med njo ter kaže, v kakšnem obsegu se lahko preskus uspešno uporablja v več laboratorijih; imenuje se tudi obnovljivost v različnih laboratorijih (1).

Obnovljivost v laboratoriju: določitev, v kakšnem obsegu lahko usposobljene osebe v istem laboratoriju uspešno ponovijo rezultate z uporabo določenega protokola ob različnih časih. Imenuje se tudi obnovljivost znotraj laboratorija (1).

LEC: najnižja efektivna koncentracija je najnižja koncentracija preskusne kemikalije, ki povzroči odziv (tj. najnižja koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri se razmerje indukcije statistično razlikuje od sočasne kontrole z vehiklom).

Podoben preskus: pogovorni izraz za preskus, ki je strukturno in funkcionalno podoben validirani in sprejeti referenčni preskusni metodi. Uporablja se kot sopomenka za podobno preskusno metodo.

PBTG: smernica za preskušanje na podlagi učinkovitosti.

Standardi izvajanja: standardi, ki temeljijo na validirani preskusni metodi in so podlaga za oceno primerljivosti predlaganega preskusa, ki je funkcijsko in mehanistično podoben. Vključujejo: (1) nujne elemente preskusa; (2) najkrajši možni seznam referenčnih kemikalij, izbranih iz skupine kemikalij, ki se uporabljajo za dokazovanje sprejemljive učinkovitosti validirane preskusne metode, ter (3) primerljive stopnje točnosti in zanesljivosti, ki temeljijo na rezultatih validirane preskusne metode, kar mora dokazati predlagani preskus pri ocenjevanju ob uporabi najkrajšega možnega seznama referenčnih kemikalij (1).

Snovi za preverjanje usposobljenosti: podskupina referenčnih snovi, vključenih v standarde izvajanja, ki jih lahko laboratoriji uporabijo za dokazovanje tehnične usposobljenosti za standardiziran preskus. Običajno so med merili za izbor teh snovi: da predstavljajo celoten razpon odzivov, da so na voljo na trgu in da so zanje na voljo visokokakovostni referenčni podatki.

Usposobljenost: dokazana sposobnost za pravilno izvedbo preskusa pred preskušanjem neznanih snovi.

Referenčni estrogen: 17 β -estradiol (E2, št. CAS 50-28-2).

Referenčne preskusne metode: preskusi, na katerih temelji PBTG 493.

RBA: relativna vezavna afiniteta. Relativna vezavna afiniteta snovi se izračuna kot delež logaritma (IC₅₀) za snov v razmerju do logaritma (IC₅₀) za 17 β -estradiol.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni, v kakšnem obsegu se s preskusom pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusa (1).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusa v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Ocenjuje se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih.

SO: standardni odklon.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

Validirana preskusna metoda: preskus, za katerega sta bili na podlagi končanih validacijskih študij določeni ustreznost (vključno s točnostjo) in zanesljivost za določen namen. Opozoriti je treba, da točnost in zanesljivost validirane preskusne metode nista nujno zadostni, da bi bila sprejemljiva za predlagani namen (1).

Validacija: postopek, s katerim se določita zanesljivost in ustreznost posameznega pristopa, metode, preskusa, postopka ali ocene za opredeljen namen (1).

Dodatek 2

FREYBERGER-WILSONOVA IN VITRO PRESKUSA VEZAVE Z NASIČENJEM IN KOMPETITIVNE VEZAVE NA ESTROGENSKI RECEPTOR (ERα) Z UPORABO CELOTNEGA REKOMBINANTNEGA ERα

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

1. Pri tem *in vitro* preskusu vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave na estrogenski receptor (ERα) se uporablja celotni človeški receptor ERα (hrERα), ki nastane v celicah žuželk, okuženih z bakulovirusom, nato pa se iz njih izolira. Protokol, ki sta ga razvila Freyberger in Wilson, je bil predmet mednarodne validacijske študije, izvedene v več laboratorijih (2), ki je dokazala njegovo ustreznost in zanesljivost za predvideni namen preskusa.
2. Ta preskus je presejalni postopek za opredelitev snovi, ki se lahko vežejo na celotno hrERα. Uporablja se za določitev zmožnosti preskusne kemikalije, da tekmuje s 17β-estradiolom za vezavo na hrERα. Rezultati kvantitativne analize lahko vključujejo IC₅₀ (merjenje koncentracije preskusne kemikalije, potrebne, da izpodrine polovico [³H]-17β-estradiola z hrERα) in relativne vezavne afinitete preskusnih kemikalij za hrERα v primerjavi s 17β-estradiolom. Za namene presejanja kemikalij lahko sprejemljivi rezultati kvalitativne analize vključujejo razvrstitve preskusnih kemikalij kot snovi, ki se vežejo na hrERα, snovi, ki se ne vežejo, ali dvomne snovi na podlagi meril, opisanih za krivulje vezave.
3. Pri preskusu se uporabi radioaktivno označen ligand, zaradi katerega laboratorij potrebuje dovoljenje za radioaktivne materiale. Vsi postopki z radioizotopi in nevarnimi kemikalijami morajo potekati v skladu s predpisi in postopki, kot so opisani v nacionalni zakonodaji.
4. Pred uporabo tega preskusa za regulativne namene je treba prebrati oddelka „**SPLOŠNI UVOD**“ in „**ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrERα**“. Opredelitve in kratice, uporabljene v tej smernici za preskušanje, so opisane v Dodatku 1.

NAČELA PRESKUSA (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

5. S preskusom vezave na hrERα se meri zmožnost radioaktivno označenega liganda ([³H]17β-estradiol), da se veže na ER ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije (tj. kompetitorja). Preskusne kemikalije, ki imajo visoko afiniteto do ER, tekmujejo z radioaktivno označenim ligandom pri nižji koncentraciji kot kemikalije z nižjo afiniteto do receptorja.
6. Ta preskus je sestavljen iz dveh večjih delov: poskusa vezave z nasičenjem za opredelitev parametrov interakcije receptor-ligand in nato poskusa kompetitivne vezave ER, za katerega je značilno tekmovanje med preskusno kemikalijo in radioaktivno označenim ligandom za vezavo na ER.
7. Namen poskusa vezave z nasičenjem je opredeliti določeno serijo receptorjev za vezavno afiniteto in število vezav kot pripravo na poskus kompetitivne vezave. S poskusom vezave z nasičenjem se v pogojih stacionarnega stanja merita afiniteta stalne koncentracije estrogenskega receptorja do njegovega naravnega liganda (ki jo predstavlja disociacijska konstanta, K_d) in koncentracija aktivnih receptorskih mest (B_{max}).
8. S poskusom kompetitivne vezave se meri afiniteta snovi, da tekmuje z [³H]17β-estradiolom za vezavo na ER. Afiniteta je kvantificirana s koncentracijo preskusne kemikalije, ki v stacionarnem stanju zavira 50 % specifične vezave [³H]17β-estradiola (tako imenovana inhibicijska koncentracija 50 % ali IC₅₀). To se lahko oceni tudi na podlagi relativne vezavne afinitete (RBA glede na IC₅₀ estradiola, merjeno ločeno v isti ponovitvi). S poskusom kompetitivne vezave se meri vezava [³H]17β-estradiola pri stalni koncentraciji v prisotnosti širokega razpona (osem redov velikosti) koncentracij preskusne kemikalije. Če je mogoče, se nato podatki prilagodijo obliki Hillove enačbe (Hill, 1910), ki opisuje izpodrinjenje radioaktivno označenega liganda s kompetitivno snovjo, ki se veže na eno mesto. Glede na obseg izpodrinjenja radioaktivno označenega estradiola v stacionarnem stanju se preskusna kemikalija opredeli kot snov, ki se veže, snov, ki se ne veže, ali snov, ki povzroči dvoumen odziv.

POSTOPEK

Dokazovanje sprejemljive učinkovitosti proteina hrERa

9. Pred rednim izvajanjem preskusov vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave je treba za vsako novo serijo hrERa dokazati pravilno delovanje v laboratoriju, v katerem bo uporabljena. Za dokaz učinkovitosti je treba uporabiti postopek v dveh korakih. Ta koraka sta naslednja:
- izvedite preskus vezave z nasičenjem [^3H]-17 β -estradiola, da dokažete specifičnost in nasičenost hrERa. Analiza teh podatkov z nelinearno regresijo (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) in dobljeni Scatchardov diagram morata dokumentirati vezavno afiniteto hrERa [^3H]-17 β -estradiola (Kd) in število receptorjev (Bmax) za vsako serijo hrERa;
 - izvedite preskus kompetitivne vezave z uporabo kontrolnih snovi (referenčnega estrogena (17 β -estradiola), snovi, ki se veže šibko (npr. noretinodrela ali noretindrona), in snovi, ki se ne veže (oktiltrietoksisilana, OTES). Vsak laboratorij mora vzpostaviti zbirko podatkov iz preteklih preskusov, da dokumentira skladnost IC₅₀ in drugih ustreznih vrednosti za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko, med poskusi in različnimi serijami hrERa. Parametri krivulj kompetitivne vezave za kontrolne snovi morajo biti v mejah 95-odstotnega intervala zaupanja (glej preglednico 1), ki so bile določene na podlagi podatkov laboratorijev, sodelujočih v validacijski študiji za ta preskus (2).

Preglednica 1

Merila za učinkovitost, razvita za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko, preskus vezave FW hrER

Snov	Parameter	Srednja vrednost ^(a)	Standardni odklon (n)	95-odstotni intervali zaupanja ^(b)	
				Spodnja meja	Zgornja meja
17β-estradiol	Vrh (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Dno (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hillov naklon	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	LogIC ₅₀ (M)	-8,92 ^(c)	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretinodrel	Vrh (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Dno (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillov naklon	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC ₅₀ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindron^c	Vrh (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Dno (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillov naklon	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC ₅₀ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

^(a) Srednja vrednost (n) $\pm$ standardni odklon (SD) sta bila izračunana na podlagi ocen parametrov prileganja krivulji (4-parametrski Hillova enačba) za kontrolne ponovitve, izvedene v štirih laboratorijih med validacijsko študijo (glej Prilogo N k viru 2).

^(b) Pri merilih za sprejemljivost so kot vodilo navedeni 95-odstotni intervali zaupanja.

^(c) Preskušanje noretindrona za podnalogo 4 med validacijsko študijo ni bilo obvezno (glej vir 2, podnalogo 4). Tako sta bila srednja vrednost $\pm$ standardni odklon (SD) (n) izračunana na podlagi ocen prileganja krivulji (4-parametrski Hillova enačba) za kontrolne ponovitve, izvedene v dveh laboratorijih.

Razpon IC₅₀ je odvisen od Kd pripravka receptorja in koncentracije radioaktivno označenega liganda, uporabljenih v vsakem laboratoriju. Dopustna je ustrezna prilagoditev razpona IC₅₀ na podlagi pogojev, uporabljenih za izvedbo preskusa.

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija

10. Glej odstavka 17 in 18 ter preglednico 2 v oddelku „ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER“ te preskusne metode. Vsak preskus (vezava z nasičenjem in kompetitivna vezava) morajo sestavljati tri neodvisne ponovitve (tj. s svežimi razredčinami receptorja, kemikalij in reagentov) na različne dneve, vsaka ponovitev pa mora vsebovati tri ponovljene vzorce.

Določitev koncentracije receptorja (hrERa)

11. Koncentracija aktivnega receptorja se nekoliko razlikuje glede na serijo in pogoje shranjevanja. Iz tega razloga je treba določiti koncentracijo aktivnega receptorja, kot se prejme od dobavitelja. Tako se dobi ustrezna koncentracija aktivnega receptorja ob ponovitvi.
12. V pogojih, ki ustrezajo kompetitivni vezavi (tj. 1 nM [^3H]-estradiola), je treba nominalne koncentracije 0,25, 0,5, 0,75 in 1 nM receptorja inkubirati v odsotnosti (celotna vezava) in prisotnosti (nespecifična vezava) 1 μM neoznačenega estradiola. Specifična vezava, izračunana kot razlika med skupno in nespecifično vezavo, se grafično prikaže v odvisnosti od nominalne koncentracije receptorja. Koncentracija receptorja, pri kateri vrednosti specifične vezave ustrezajo 20 % dodanega izotopskega označevalca, se poveže z ustrezno nominalno koncentracijo receptorja, in to koncentracijo receptorja je treba uporabiti za poskuse vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave. Pogosto temu pogoju ustreza končna koncentracija hrER 0,5 nM.
13. Če merila 20 % večkrat ni mogoče izpolniti, je treba preveriti morebitne napake v zasnovi poskusa. Neizpolnjevanje merila 20 % lahko nakazuje, da je v rekombinantni seriji zelo malo aktivnega receptorja, zato je treba razmisliti o uporabi druge serije receptorja.

Preskus z nasičenjem

14. Osem naraščajočih koncentracij [^3H]-17 β -estradiola je treba oceniti v treh ponovitvah v naslednjih treh pogojih (glej preglednico 2):
 - v odsotnosti neoznačenega 17 β -estradiola in prisotnosti ER. To je določitev celotne vezave z merjenjem radioaktivnosti v jamicah, v katerih je samo [^3H]-17 β -estradiol;
 - v prisotnosti 1 000-kratne presežne koncentracije neoznačenega 17 β -estradiola v primerjavi z označenim 17 β -estradiolom in prisotnosti ER. Namen tega pogoja je nasičiti aktivna vezavna mesta z neoznačenim 17 β -estradiolom in z merjenjem radioaktivnosti v jamicah določiti nespecifično vezavo. Za ves preostali vroči estradiol, ki se lahko veže na receptor, se šteje, da se veže na nespecifično mesto, saj mora biti koncentracija hladnega estradiola tako visoka, da je vezan na vsa razpoložljiva specifična mesta na receptorju;
 - v odsotnosti neoznačenega 17 β -estradiola in odsotnosti ER (določitev skupne radioaktivnosti).

Priprava raztopin [^3H]-17 β -estradiola in neoznačenega 17 β -estradiola

15. Razredčine [^3H]-17 β -estradiola je treba pripraviti z dodajanjem analiznega pufra v osnovne raztopine [^3H]-17 β -estradiola s koncentracijo 12 nM, da se dobijo koncentracije, ki sprva segajo od 0,12 nM do 12 nM. Z dodajanjem 40 μl teh raztopin v ustrezne preskusne jamice na 96-jamični mikrotitrski plošči (v končno količino 160 μl) se dobijo končne preskusne koncentracije, ki segajo od 0,03 do 3,0 nM. Priprava analiznega pufra, osnovne raztopine in razredčin [^3H]-17 β -estradiola ter določitev koncentracij sta podrobno opisani v protokolu FW (2).
16. Razredčine etanolnih raztopin 17 β -estradiola je treba pripraviti z dodajanjem analiznega pufra, da se dobi osem naraščajočih koncentracij, ki prvotno segajo od 0,06 μM do 6 μM . Z dodajanjem 80 μl teh raztopin v ustrezne preskusne jamice na 96-jamični mikrotitrski plošči (v končno količino 160 μl) se dobijo končne preskusne koncentracije, ki segajo od 0,03 μM do 3,0 μM . Končna koncentracija neoznačenega 17 β -estradiola v posameznih preskusnih jamicah za nespecifično vezavo mora biti 1 000-kratnik koncentracije označenega [^3H]-17 β -estradiola. Priprava razredčin neoznačenega 17 β -estradiola je podrobno opisana v protokolu FW (2).

17. Uporabiti je treba nominalno koncentracijo receptorja, ki daje $20 \pm 5\%$ specifične vezave (glej odstavka 12 in 13). Raztopino hrERa je treba pripraviti neposredno pred uporabo.
18. 96-jamične mikrotitrne plošče se pripravijo, kot je prikazano v preglednici 2, s tremi ponovljenimi vzorci na koncentracijo. Primer razvrstitve $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiola, neoznačenega 17 β -estradiola, pufra in receptorja glede na koncentracijo in količino je naveden v Dodatku 2.2.

Preglednica 2

Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus vezave z nasičenjem

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER			0,06 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER			0,08 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER			0,10 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER			Celotna vezava (topilo)
B	0,30 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER			0,60 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER			1,0 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER			3,0 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER			
C													
D	0,03 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER + 0,10 μM E2			Nespecifična vezava
E	0,30 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM $[^3\text{H}]$ E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G													
H													

$[^3\text{H}]$ E2: $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiol.

ER: estrogenski receptor.

E2: neoznačen 17 β -estradiol.

19. Preskusne mikrotitrne plošče je treba 16–20 ur inkubirati pri 2–8 °C in jih med inkubacijo namestiti na rotator.

Meritev $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiola, vezanega na hrERa

20. $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiol, vezan na hrERa, je treba ločiti od prostega $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiola z dodajanjem 80 μl hladne raztopine DCC v vsako jamico, 10-minutnim stresanjem mikrotitrskih plošč in 10-minutnim centrifugiranjem pri približno 2 500 vrt./min. Da se med tem postopkom čim bolj zmanjša disociacija vezanega $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiola od hrERa, je izjemno pomembno, da se pufri in preskusne jamice vzdržujejo pri 2–8 °C in da se vsaka faza izvede hitro. Za učinkovito in hitro obdelavo plošč je potreben stresalnik mikrotitrskih plošč.
21. S 50 μl supernatanta, ki vsebuje na hrERa vezan $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiol, je treba ravnati nadvse previdno, da se prepreči kontaminacija jamic z dotikanjem DCC, in ga je treba namestiti na drugo mikrotitrsko ploščo.
22. V vsako jamico je nato treba dodati 200 μl scintilacijske tekočine, ki je sposobna kinetično energijo nuklearnih emisij pretvoriti v svetlobno energijo (A1–B12 in od D1 do E12). Jamice G1–H12 (opredeljene kot skupno število razgradenj na minuto) predstavljajo zaporedne razredčine $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiola (40 μl), ki jih je treba dodati neposredno v scintilacijsko tekočino v jamicah merilne plošče, kot je navedeno v preglednici 3, tako da te jamice vsebujejo samo 200 μl scintilacijske tekočine in ustrezno razredčino $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiola. Te meritve pokažejo, koliko $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiola v razgradnjah na minuto je bilo dodanega vsakemu nizu jamic za celotno vezavo in nespecifično vezavo.

Preglednica 3

Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus vezave z nasičenjem, merjenje radioaktivnosti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER			Celotna vezava (topilo)
B	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,03 μM E ₂			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,06 μM E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,08 μM E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,10 μM E ₂			Nespecifična vezava
E	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,30 μM E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,60 μM E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 1,0 μM E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 3,0 μM E ₂			
F													
G	0,03 nM [³ H] E ₂ (skupno število razgradenj na minuto)			0,06 nM [³ H] E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂			Skupno število razgradenj na minuto (*)
H	0,30 nM [³ H] E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂			

[³H] E₂: [³H]-17β-estradiol.

ER: estrogenski receptor.

E₂: neoznačen 17β-estradiol.

dpms: razgradnje na minuto

(*) Vroče serijske razredčine [³H]-označenega estradiola je treba v tem primeru neposredno dodati v 200 μl scintilacijske tekočine v jamicah G1–H12.

23. Meritev se mora začeti z najmanj dvournim zamikom, čas štetja pa mora biti 40 minut na jamico. Za določitev razgradnje na minuto/jamico s korekcijo pojenja je treba uporabiti scintilacijski števec za mikrotitrsko ploščo. Če ni na voljo, se lahko vzorci izmerijo v običajnem števcu. V teh pogojih se lahko razmisli o skrajšanju časa štetja.

Preskus kompetitivne vezave

24. S preskusom kompetitivne vezave se meri vezava ene same koncentracije [³H]-17β-estradiola ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije. Za vsako koncentracijo je treba pri eni ponovitvi uporabiti tri sočasne ponovljene vzorce. Poleg tega je treba za vsako kemikalijo, ki se preskuša, izvesti tri nesočasne ponovitve. Preskus je treba zasnovati na eni ali več 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah.

Kontrole

25. Pri izvajanju preskusa je treba v vsak poskus sočasno vključiti topilo in kontrole (tj. referenčni estrogen, snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Na eni plošči je treba med vsako ponovitvijo uporabiti celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole (tj. snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Vse druge plošče morajo vsebovati (i) visoko (največje izpodrinjenje) in srednjo (približno IC₅₀) koncentracijo vsakega od E₂ in snovi, ki se veže šibko, v treh ponovitvah; (ii) kontrolo s topilom in nespecifično vezavo, vsako v vsaj treh ponovitvah. Postopki za pripravo analiznega pufra, kontrol, [³H]-17β-estradiola, hrERa in raztopin preskusne kemikalije so opisani v sklicu 2 (Priloga K, glej protokol preskusa FW).

Kontrola s topilom:

26. Kontrola s topilom pokaže, da topilo ne reagira s preskusnim sistemom, in poleg tega meri celotno vezavo (TB). Priporočeno topilo je etanol. Če pa najvišja koncentracija preskusne kemikalije ni topna v etanolu, se lahko uporabi DMSO. Koncentracija etanola ali DMSO, če se uporabi, v končnih preskusnih jamicah je 1,5-odstotna in ne sme presežati 2 %.

Kontrola s pufrom:

27. Kontrola s pufrom (BC) ne sme vsebovati niti topila niti preskusne kemikalije, pač pa mora vsebovati vse druge elemente preskusa. Rezultati kontrole s pufrom se primerjajo s kontrolo s topilom, da se potrdi, da uporabljeno topilo ne vpliva na preskusni sistem.

Snov, ki se veže močno (referenčni estrogen)

28. 17 β -estradiol (CAS 50-28-2) je endogeni ligand in se z visoko afiniteto veže na ER, podtip alfa. Za vsak preskus kompetitivne vezave na hrERa je treba z uporabo neoznačenega 17 β -estradiola pripraviti standardno krivuljo, da se omogoči ocena variabilnosti, ko se preskus v daljšem časovnem obdobju izvaja v istem laboratoriju. Osem raztopin neoznačenega 17 β -estradiola je treba pripraviti v etanolu, pri čemer koncentracije v preskusnih jamicah segajo od 100 nM do 10 pM (od -7[logM] do -11[logM]), razporejene pa so tako: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], -9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). Najvišja koncentracija neoznačenega 17 β -estradiola (1 μ M) se uporabi tudi kot indikator nespecifične vezave. Ta koncentracija je v preglednici 4 označena kot 'NSB', čeprav je tudi del standardne krivulje.

Snov, ki se veže šibko

29. Vključiti je treba snov, ki se veže šibko (noretinodrel (CAS68-23-5) ali noretindron (CAS 68-22-4)), da se dokaže občutljivost vsakega poskusa in omogoči ocena variabilnosti pri izvajanju preskusa v daljšem časovnem obdobju. Osem raztopin snovi, ki se veže šibko, je treba pripraviti v etanolu, pri čemer koncentracije v preskusnih jamicah segajo od 3 nM do 30 μ M (od -8,5[logM] do -4,5[logM]), razporejene pa so tako: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM].

Snov, ki se ne veže

30. Kot negativno kontrolo (snov, ki se ne veže) je treba uporabiti oktiltrietoksisilan (OTES, CAS 2943-75-1). Ta zagotavlja, da se s preskusom, kot je izveden, zazna, kdaj se preskusne kemikalije ne vežejo na hrERa. Osem raztopin snovi, ki se ne veže, je treba pripraviti v etanolu, pri čemer koncentracije v preskusnih jamicah segajo od 0,1 nM do 1 000 μ M (od -10[logM] do -3[logM]), tako da logaritemsko naraščajo. Kot nadomestna kontrolna snov, ki se ne veže, se lahko uporabi di-n-butyl ftalat (DBP). Njegova največja topnost dokazano znaša -4[logM].

Koncentracija hrERa

31. Uporabiti je treba količino receptorja, ki daje 20 ± 5 % specifične vezave 1 nM radioaktivno označenega liganda (glej odstavka 12 in 13 Dodatka 2). Raztopino hrERa je treba pripraviti neposredno pred uporabo.

[3H]-17 β -estradiol

32. Koncentracija [3 H]-17 β -estradiola v preskusnih jamicah mora znašati 1,0 nM.

Preskusne kemikalije

33. Najprej je treba izvesti preskus topnosti, da se določi meja topnosti za vsako preskusno kemikalijo in opredeli ustrezno območje koncentracije, ki se uporabi pri izvajanju preskusnega protokola. Mejo topnosti vsake preskusne kemikalije je treba najprej določiti v topilu in nato dodatno potrditi v pogojih preskusa. Končna koncentracija, preskušena v preskusu, ne sme presegati 1 mM. Preskušanje z določanjem območja sestavljajo kontrola s topilom in osem logaritemskih zaporednih razredčin, ki se začnejo pri najvišji dopustni koncentraciji (npr. 1 mM ali manj, odvisno od meje topnosti), ter evidentiranje morebitne motnosti ali oborine (glej tudi odstavek 35). Preskusno kemikalijo je treba preskusiti z uporabo osmih logaritemskih krivulj, ki se med seboj razlikujejo glede na koncentracijo, kot je opredeljeno s predhodnim preskusom za določanje območja. Koncentracije pri drugem in tretjem poskusu je treba ustrezno prilagoditi, da se bolje izrazi krivulja odziva na koncentracijo.
34. Razredčine preskusne kemikalije je treba pripraviti v ustreznem topilu (glej odstavek 26 Dodatka 2). Če najvišja koncentracija preskusne kemikalije ni topna niti v etanolu niti v DMSO, z dodajanjem več topila pa bi koncentracija topila v končni epruveti presegala dopustno mejo, se lahko najvišja koncentracija zniža na naslednjo nižjo koncentracijo. V tem primeru se lahko dodatna koncentracija doda na spodnjem koncu niza koncentracij. Preostale koncentracije v nizu morajo ostati nespremenjene.

35. Raztopine preskusne kemikalije je treba ob dodajanju v preskusno jamico pazljivo spremljati, saj lahko preskusna kemikalija ob dodajanju v preskusno jamico obori. Podatke za vse jamice, ki vsebujejo oborino, je treba izključiti iz prileganja krivulje in navesti razlog za izključitev.
36. Če obstajajo predhodne informacije iz drugih virov, ki zagotavljajo $\log(IC_{50})$ preskusne kemikalije, je morda ustrezno, da se razredčine razporedijo geometrično (tj. 0,5 logaritemske enote okrog pričakovanega $\log(IC_{50})$). V končnem rezultatu je treba upoštevati zadostno razpršenost koncentracij na obe strani $\log(IC_{50})$, vključno z zgornjo in spodnjo stranjo, tako da je mogoče krivuljo vezave ustrezno opredeliti.

Razporeditev na preskusni plošči

37. Pripravi je treba označene mikrotitrne plošče, pri tem pa upoštevati šestkratne inkubacije z oznakami za kontrolo s topilom, najvišjo koncentracijo referenčnega estrogena, ki se uporablja tudi kot indikator nespecifične vezave (NSB), in kontrolo s pufrom, tako da se upoštevajo trikratne inkubacije z oznakami za vsako od osmih koncentracij kontrole s snovjo, ki se ne veže (oktiltrietoksisilan), sedem nižjih koncentracij referenčnega estrogena, osem koncentracij velikosti odmerka snovi, ki se veže šibko, in osem koncentracij vsake preskusne kemikalije (TC). Primer razporeditve diagrama plošče za celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole je naveden v preglednici 4 v nadaljevanju. Za preskusne kemikalije se uporabijo dodatne mikrotitrne plošče, ki morajo vključevati kontrole plošč, tj. 1) visoko (največje izpodrinjenje) in srednjo (približno IC_{50}) koncentracijo vsakega od E2 in snovi, ki se veže šibko, v treh ponovitvah; 2) kontrolo s topilom in nespecifično vezavo, vsako v treh ponovitvah (preglednica 5). Primer delovnega lista z razporeditvijo na mikrotitrski plošči za kompetitivni preskus z uporabo treh neznanih preskusnih kemikalij je naveden v Dodatku 2.3. Koncentracije, navedene v preglednicah 4 in 5, so končne koncentracije preskusa. Največja koncentracija za E2 mora biti 1×10^{-7} M, za snov, ki se veže šibko, pa je treba uporabiti najvišjo koncentracijo, uporabljeno za snov, ki se veže šibko, na plošči 1. Koncentracijo IC_{50} mora določiti laboratorij na podlagi svoje zbirke podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov. Pričakuje se, da bo ta vrednost podobna vrednosti iz validacijskih študij (glej preglednico 1).

Preglednica 4

Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus kompetitivne vezave, celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole (plošča 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (samo topilo)			TB (samo topilo)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Slepi vzorec (*)		
D	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7,5}$)			NE ($1 \times 10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Slepi vzorec (za vroče) (**)			Slepi vzorec (za vroče) (**)			Kontrola s pufrom			Kontrola s pufrom		

V tem primeru je snov, ki se veže šibko, noretinodrel (NE)

(*) dejanski slepi vzorec, jamica se ne uporablja;

(**) slepi vzorec se ne uporablja med inkubacijo, temveč se uporabi za potrditev skupne dodane radioaktivnosti.

Preglednica 5

Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus kompetitivne vezave, celotne krivulje koncentracije za preskusne kemikalije in kontrole plošč

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (samo topilo)			TB (samo topilo)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC ₅₀)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC ₅₀)			E2 (1×10^{-7})		

V tem primeru je snov, ki se veže šibko, noretinodrel (NE).

Dokončanje preskusa kompetitivne vezave

38. Kot je prikazano v preglednici 6, je treba v jamice dodati 80 µl kontrole s topilom, kontrole s pufrom, referenčnega estrogena, snovi, ki se veže šibko, snovi, ki se ne veže, in preskusnih kemikalij, pripravljenih v analiznem pufru. Nato je treba v vsako jamico dodati 40 µl raztopine [³H]-17β-estradiola s koncentracijo 4 nM. Po 10–15-minutnem rahlem vrtenju pri 2–8 °C je treba dodati 40 µl raztopine hrERα. Preskusne mikrotitrne plošče je treba 16–20 ur inkubirati pri 2–8 °C in med inkubacijo namestiti na rotator.

Preglednica 6

Količina preskusnih elementov za preskus kompetitivne vezave hrER, mikrotitrne plošče

Količina (µl)	Sestavina
80	neoznačen 17β-estradiol, noretinodrel, OTES, preskusne kemikalije, topilo ali pufer
40	raztopina [³ H]-17β-estradiola s koncentracijo 4 nM
40	raztopina hrERα, koncentracija, kot je določena
160	Skupna količina v vsaki preskusni jamici

39. Nato je treba izvesti kvantifikacijo [³H]-17β-estradiola, vezanega na hrERα, po ločitvi [³H]-17β-estradiola, vezanega na hrERα, od prostega [³H]-17β-estradiola, tako da se v vsako jamico doda 80 µl hladne raztopine DCC, kot je v odstavkih 20–23 opisano za preskus vezave z nasičenjem.

40. Jamice H1–6 (v preglednici 4 opredeljene kot slepi vzorec (za vroče)) predstavljajo razgradnje na minuto [³H]-označenega-estradiola v 40 µl. 40 µl alikvota je treba dodati neposredno scintilacijski tekočini v jamicah H1–H6.

Merila za sprejemljivost

Preskus vezave z nasičenjem

41. Krivulja specifične vezave mora doseči stacionarno stanje, ko se uporabijo naraščajoče koncentracije [^3H]-17 β -estradiola, kar kaže na nasičenje hrERa z ligandom.
42. Specifična vezava pri [^3H]-17 β -estradiolu s koncentracijo 1 nM mora biti znotraj sprejemljivega razpona 15–25 % povprečne izmerjene skupne radioaktivnosti, dodane med ponovitvami. Občasni rahli odmiki od tega razpona so dopustni, če pa so ponovitve stalno zunaj tega razpona ali je posamezna ponovitev precej zunaj tega razpona, je treba koncentracijo proteina prilagoditi in preskus z nasičenjem ponoviti.
43. Podatki morajo dati linearen Scatchardov diagram.
44. Nespecifična vezava ne sme biti prevelika. Vrednost za nespecifično vezavo mora običajno znašati < 35 % celotne vezave. Če se meri zelo nizka razgradnja na minuto za najnižjo koncentracijo radioaktivno označenega preskušenege 17 β -estradiola, pa lahko količnik to mejno vrednost občasno preseže.

Preskus kompetitivne vezave

45. Naraščajoče koncentracije neoznačenega 17 β -estradiola morajo izpodriniti [^3H]-17 β -estradiol z receptorja na način, ki je skladen s kompetitivno vezavo na eno mesto.
46. Vrednost IC_{50} za referenčni estrogen (tj. 17 β -estradiol) mora biti približno enaka molski koncentraciji [^3H]-17 β -estradiola in K_d , določenemu na podlagi preskusa vezave z nasičenjem.
47. Celotna specifična vezava mora biti dosledno znotraj sprejemljivega razpona $20 \pm 5\%$, če je povprečna izmerjena koncentracija skupne radioaktivnosti, dodane vsaki jamici, v različnih ponovitvah znašala 1 nM. Občasni rahli odmiki od tega razpona so dopustni, če pa so ponovitve stalno zunaj tega razpona ali je posamezna ponovitev precej zunaj tega razpona, je treba koncentracijo proteina prilagoditi.
48. Topilo ne sme spremeniti občutljivosti ali obnovljivosti preskusa. Rezultati kontrole s topilom (jamice TB) se primerjajo s kontrolo s pufrom, da se potrdi, da uporabljeno topilo ne vpliva na preskusni sistem. Če ni učinkov topila na preskus, morajo biti rezultati TB in kontrole s pufrom primerljivi.
49. Snov, ki se ne veže, ne sme izpodriniti več kot 25 % [^3H]-17 β -estradiola s hrERa, ko se preskusi do 10^{-3} M (OTES) ali 10^{-4} M (DBP).
50. Merila za učinkovitost so bila razvita za referenčni estrogen in dve snovi, ki se vežeta šibko (npr. noretinodrel, noretindron), pri čemer so bili uporabljeni podatki iz validacijske študije preskusa vezave hrER FW (Priloga N k viru 2). za vse kontrolne ponovitve v laboratorijih, ki sodelujejo v validacijski študiji, so za srednjo vrednost (n) +/- standardni odklon določeni 95-odstotni intervali zaupanja. 95-odstotni intervali zaupanja so bili izračunani za parametre prileganja krivulje (tj. vrh, dno, Hillov naklon, $\log\text{IC}_{50}$) za referenčni estrogen in snovi, ki se vežejo šibko, ter za $\log_{10}\text{RBA}$ snovi, ki se vežejo šibko, glede na referenčni estrogen, določeni pa so kot merila za učinkovitost za pozitivne kontrole. V preglednici 1 so določeni pričakovani razponi za parametre prileganja krivulje, ki se lahko uporabijo kot merila za učinkovitost. V praksi se lahko razpon IC_{50} nekoliko razlikuje, odvisno od K_d priprava receptorja in koncentracije liganda.

51. Zaradi najrazličnejših obstoječih potencialnih preskusnih kemikalij ter razlik v potencialnih afinitetah in rezultatih (npr. celotna krivulja, delna krivulja, brez prileganja krivulje) pa niso bila razvita merila za učinkovitost za parametre prileganja krivulje za preskusne kemikalije. Vendar je treba pri pregledu rezultatov iz vsake ponovitve za preskusno kemikalijo uporabiti strokovno presojo. Uporabiti je treba dovolj veliko območje koncentracij preskusne kemikalije, da se jasno opredeli vrh (npr. 90–100 % vezave) kompetitivne krivulje. Variabilnost med ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije in med tremi nesočasnimi ponovitvami mora biti mogoče razumno in znanstveno utemeljiti. Kontrole iz vsake ponovitve za preskusno kemikalijo se morajo približati meritvam učinkovitosti, sporočenim za ta preskus FW, in se ujemati s podatki zadevnega laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov.

ANALIZA PODATKOV

Preskus vezave z nasičenjem

52. Izmerita se celotna vezava in nespecifična vezava. Iz teh vrednosti se izračuna specifična vezava naraščajočih koncentracij [^3H]-17 β -estradiola v pogojih stacionarnega stanja, tako da se nespecifična vezava odšteje od celotne vezave. Graf specifične vezave v odvisnosti od koncentracije [^3H]-17 β -estradiola mora doseči stacionarno stanje za največjo specifično vezavo, značilno za nasičenje hrERa z [^3H]-17 β -estradiolom. Poleg tega je treba v analizi podatkov dokumentirati vezavo [^3H]-17 β -estradiola na eno samo vezavno mesto z visoko afiniteto. Na krivulji vezave z nasičenjem morajo biti prikazane nespecifična, skupna in specifična vezava. Pri nadaljnji analizi teh podatkov je treba uporabiti analizo nelinearne regresije (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s končnim prikazom podatkov v obliki Scatchardovega diagrama.
53. S podatkovno analizo je treba določiti Bmax in Kd zgolj na podlagi podatkov o celotni vezavi, pri čemer se domneva, da je nespecifična vezava linearna, razen če se utemelji uporaba druge metode. Poleg tega je treba pri določanju najboljšega prileganja uporabiti robustno regresijo, razen če se poda utemeljitev. Navesti je treba izbrano metodo za robustno regresijo. Pri določanju Bmax in Kd na podlagi podatkov o vezavi z nasičenjem je treba vedno uporabiti popravek zaradi izgube liganda (npr. z uporabe metode po Swillensu, 1995).

Preskus kompetitivne vezave

54. Krivulja kompetitivne vezave se izriše kot specifična vezava [^3H]-17 β -estradiola v odvisnosti od koncentracije (enote log10) kompetitorja. Koncentracija preskusne kemikalije, ki zavre 50 % največje specifične vezave [^3H]-17 β -estradiola, je vrednost IC₅₀.
55. Ocene vrednosti log(IC₅₀) za pozitivne kontrole (npr. referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko) je treba določiti z uporabo ustrezne programske opreme za nelinearno prileganje krivulje, da ustreza štiriparametrski Hillovi enačbi (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Vrh, dno, naklon in log(IC₅₀) je treba pri prileganju teh krivulj na splošno pustiti neomejene. Pri določanju najboljšega prileganja je treba uporabiti robustno regresijo, razen če se poda utemeljitev. Popravek zaradi izgube liganda se ne sme uporabiti. Po začetni analizi je treba pregledati vsako krivuljo vezave, da se zagotovi ustrezno prileganje modelu. Relativno vezavno afiniteto (RBA) za snov, ki se veže šibko, je treba izračunati kot delež log (IC₅₀) za snov, ki se veže šibko, v odvisnosti od log (IC₅₀) za 17 β -estradiol. Rezultate iz pozitivnih kontrol in kontrole s snovjo, ki se ne veže, je treba oceniti z uporabo meril za učinkovitost preskusa iz odstavkov 45–50 tega dodatka 2.
56. Podatke za vse preskusne kemikalije je treba analizirati z uporabo stopenjskega pristopa, s čimer se zagotovi, da so podatki ustrezno analizirani in da je vsaka krivulja kompetitivne vezave ustrezno razvrščena. Priporočljivo je, da se pri vsaki ponovitvi za preskusno kemikalijo najprej izvede standardizirana podatkovna analiza, enaka tisti, ki se uporablja za kontrole z referenčnim estrogenom in snovjo, ki se veže šibko (glej odstavek 55 zgoraj). Ko je ta analiza končana, sta potrebna tehnični pregled parametrov prileganja krivulje in vizualni pregled tega, kako dobro se podatki prilegajo dobljeni krivulji kompetitivne vezave za vsako ponovitev. Med tem tehničnim pregledom so opažanja od koncentracije odvisnega zmanjšanja v deležu specifično vezanega [^3H]-17 β -estradiola, nizka variabilnost med tehničnimi ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji kemikalije in skladnost v parametrih prileganja med tremi ponovitvami dober znak, da so bili preskus in podatkovne analize izvedeni pravilno.

Razlaga podatkov

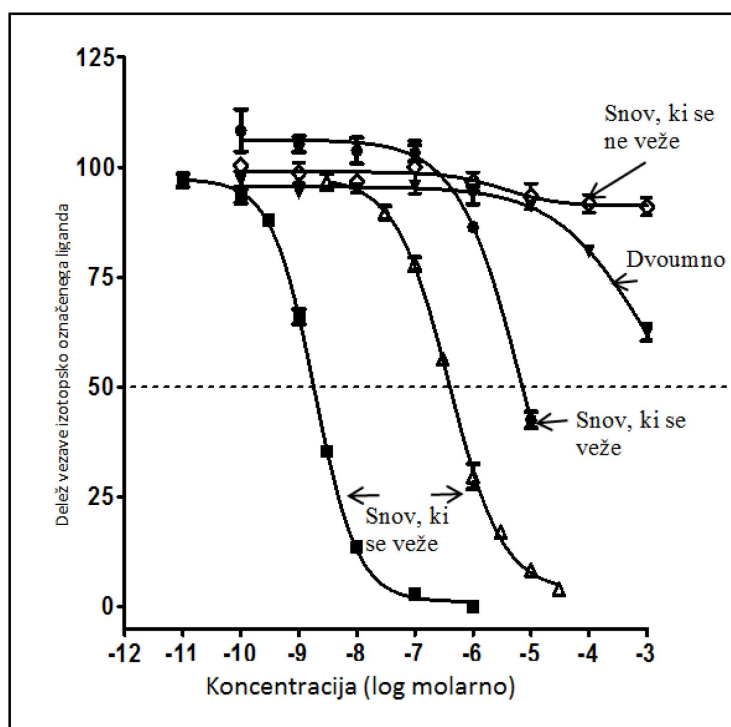
57. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za snov, ki se veže na hrER α , če je krivuljo vezave mogoče prilagoditi in je najnižja točka na krivulji odziva znotraj razpona podatkov pod 50 % (slika 1).
58. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za snov, ki se ne veže na hrER α , če:
- je krivuljo vezave mogoče prilagoditi in je najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva znotraj razpona podatkov nad 75 % ali
 - krivulje vezave ni mogoče prilagoditi in je najmanjši nezglajeni povprečni delež vezave med skupinami koncentracij v podatkih nad 75 %.
59. Preskusne kemikalije se štejejo za dvoumne, če ni izpolnjen nobeden od zgoraj navedenih pogojev (npr. najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva je med 76 % in 51 %).

Preglednica 7

Merila za določitev razvrstitve na podlagi krivulje kompetitivne vezave za preskusno kemikalijo

Razvrstitev	Merila
Snov, ki se veže ^a	Krivuljo vezave je mogoče prilagoditi. Najnižja točka na krivulji odziva znotraj razpona podatkov je pod 50 %.
Snov, ki se ne veže ^b	Če je krivuljo vezave mogoče prilagoditi, je najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva znotraj razpona podatkov nad 75 %. Če krivulje vezave ni mogoče prilagoditi, je najmanjši nezglajeni povprečni delež vezave med skupinami koncentracij v podatkih nad 75 %.
Dvoumno ^c	Vsaka preskušena ponovitev, ki ni niti snov, ki se veže, niti snov, ki se ne veže (npr. najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva je med 76 % in 51 %).

Slika 1:

Primeri razvrstitve preskusne kemikalije z uporabo krivulje kompetitivne vezave

60. V laboratoriju izvedene večkratne ponovitve za preskusno kemikalijo se združijo, tako da se vsaki ponovitvi dodelijo številčne vrednosti in se izračuna povprečje med ponovitvami, kot je prikazano v preglednici 8. Rezultati za združene ponovitve v posameznem laboratoriju se primerjajo s pričakovano razvrstitvijo za vsako preskusno kemikalijo.

Preglednica 8

Metoda za razvrstitev preskusne kemikalije z uporabo večkratnih ponovitev v laboratoriju

Za dodelitev vrednosti vsaki ponovitvi:	
Razvrstitev	Številčna vrednost
Snov, ki se veže	2
Dvoumno	1
Snov, ki se ne veže	0
Za razvrstitev povprečja številčne vrednosti med ponovitvami:	
Razvrstitev	Številčna vrednost
Snov, ki se veže	povprečje $\geq 1,5$
Dvoumno	$0,5 \leq \text{povprečje} < 1,5$
Snov, ki se ne veže	povprečje $< 0,5$

POROČILO O PRESKUSU

61. Glej odstavek 24 v oddelku „ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER“ te preskusne metode.

Dodatek 2.1

SEZNAM IZRAZOV

[³H]E2 17β-estradiol, radioaktivno označen s tritijem

DCC oglje, prevlečeno z dekstranom

E₂ neoznačen 17β-estradiol (inertni)

Analizni pufer 10 mM Trisa, 10 mg govejega serumskega albumina/ml, 2 mM DTT, 10-odstotni glicerol, 0,2 mM leupeptina, pH 7,5

hrERα človeški rekombinantni estrogenski receptor alfa.

Ponovljeni vzorec ena od več jamic, ki imajo enako vsebino pri enakih koncentracijah in se preskusijo sočasno v eni sami ponovitvi. V tem protokolu se vsaka koncentracija preskusne kemikalije preskusi v treh ponovitvah; to pomeni, da se pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije sočasno preskusijo trije ponovljeni vzorci.

Ponovitev celoten nabor jamic pri sočasno izvedenem preskusu z mikrotitrsko ploščo, ki zagotavlja vse potrebne informacije za opredelitev vezave preskusne kemikalije na hrERα (tj. skupni [³H]-17β-estradiol, dodan v preskusno jamico, največja vezava [³H]-17β-estradiola na hrERα, nespecifična vezava in celotna vezavaa pri različnih koncentracijah preskusne kemikalije). Ponovitev bi lahko sestavljala tudi ena sama preskusna jamica (tj. ponovljeni vzorec) na koncentracijo, ker pa ta protokol zahteva preskušanje v treh ponovitvah, eno ponovitev sestavljajo tri preskusne jamice na koncentracijo. Poleg tega ta protokol zahteva tri neodvisne (tj. nesočasne) ponovitve na kemikalijo.

Dodatek 2.2

ZNAČILNI PRESKUS NASIČENJA S $[^3\text{H}]$ -17 β -ESTRADIOLOM S TREMI JAMICAMI S PONOVLJENIMI VZORCI

Značilni preskus nasičenja s $[^3\text{H}]$ -17 β -estradiolom s tremi jamicami s ponovljenimi vzorci											
Položaj	Ponovljeni vzorec	Oznaka vrste jamice	Začetna koncentracija vročega E2 (nM)	Količina vročega E2 (μl)	Končna koncentracija vročega E2 (nM)	Začetna koncentracija hladnega E2 (μM)	Količina hladnega E2 (μl)	Končna koncentracija hladnega E2 (μM)	Količina pufru (μl)	Količina receptorja (μl)	Skupna količina v jamicah
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

Značilni preskus nasičenja s [3H]-17 β -estradiolom s tremi jamicami s ponovljenimi vzorci

Položaj	Ponovljeni vzorec	Oznaka vrste jamice	Začetna koncentracija vročnega E2 (nM)	Količina vročnega E2 (μ l)	Končna koncentracija vročnega E2 (nM)	Začetna koncentracija hladnega E2 (μ M)	Količina hladnega E2 (μ l)	Končna koncentracija hladnega E2 (μ M)	Količina pufru (μ l)	Količina receptorja (μ l)	Skupna količina v jamicah
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

Značilni preskus nasičenja s [3H]-17 β -estradiolom s tremi jamicami s ponovljenimi vzorci

Položaj	Ponovljeni vzorec	Oznaka vrste jamice	Začetna koncentracija vročega E2 (nM)	Količina vročega E2 (μ l)	Končna koncentracija vročega E2 (nM)	Začetna koncentracija hladnega E2 (μ M)	Količina hladnega E2 (μ l)	Končna koncentracija hladnega E2 (μ M)	Količina pufru (μ l)	Količina receptorja (μ l)	Skupna količina v jamicah
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	vroč	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	vroč	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	vroč	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	vroč	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	vroč	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	vroč	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	vroč	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	vroč	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	vroč	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	vroč	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	vroč	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	vroč	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	vroč	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	vroč	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	vroč	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	vroč	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Značilni preskus nasičenja s [3H]-17 β -estradiolom s tremi jamicami s ponovljenimi vzorci

Položaj	Ponovljeni vzorec	Oznaka vrste jamice	Začetna koncentracija vročega E2 (nM)	Količina vročega E2 (μ l)	Končna koncentracija vročega E2 (nM)	Začetna koncentracija hladnega E2 (μ M)	Količina hladnega E2 (μ l)	Končna koncentracija hladnega E2 (μ M)	Količina pufru (μ l)	Količina receptorja (μ l)	Skupna količina v jamicah
H5	2	vroč	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	vroč	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	vroč	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	vroč	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	vroč	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	vroč	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	vroč	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	vroč	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Opozoriti je treba, da so 'vroče' jamice med inkubacijo prazne. 40 μ l se doda samo za scintilacijsko štetje.

Dodatek 2.3

RAZPOREDITEV JAMIC ZA PRESKUS KOMPETITIVNE VEZAVE

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	A1	1	celotna vezava	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
trdno	A2	2	celotna vezava	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
trdno	A3	3	celotna vezava	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
trdno	A4	1	celotna vezava	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
trdno	A5	2	celotna vezava	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
trdno	A6	3	celotna vezava	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
trdno	A7	1	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
trdno	A8	2	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
trdno	A9	3	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
trdno	A10	1	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
trdno	A11	2	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
trdno	A12	3	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
trdno	B1	1	hladen E2	trdno	S1	2,00E ⁻⁷	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁷
trdno	B2	2	hladen E2	trdno	S1	2,00E ⁻⁷	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁷
trdno	B3	3	hladen E2	trdno	S1	2,00E ⁻⁷	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁷
trdno	B4	1	hladen E2	trdno	S2	2,00E ⁻⁸	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁸
trdno	B5	2	hladen E2	trdno	S2	2,00E ⁻⁸	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁸
trdno	B6	3	hladen E2	trdno	S2	2,00E ⁻⁸	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁸
trdno	B7	1	hladen E2	trdno	S3	6,00E ⁻⁹	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁹
trdno	B8	2	hladen E2	trdno	S3	6,00E ⁻⁹	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁹
trdno	B9	3	hladen E2	trdno	S3	6,00E ⁻⁹	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁹

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	B10	1	hladen E2	trdno	S4	2,00E ⁻⁹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁹
trdno	B11	2	hladen E2	trdno	S4	2,00E ⁻⁹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁹
trdno	B12	3	hladen E2	trdno	S4	2,00E ⁻⁹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁹
trdno	C1	1	hladen E2	trdno	S5	6,00E ⁻¹⁰	40	—	40	80	160	3,0E ⁻¹⁰
trdno	C2	2	hladen E2	trdno	S5	6,00E ⁻¹⁰	40	—	40	80	160	3,0E ⁻¹⁰
trdno	C3	3	hladen E2	trdno	S5	6,00E ⁻¹⁰	40	—	40	80	160	3,0E ⁻¹⁰
trdno	C4	1	hladen E2	trdno	S6	2,00E ⁻¹⁰	40	—	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
trdno	C5	2	hladen E2	trdno	S6	2,00E ⁻¹⁰	40	—	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
trdno	C6	3	hladen E2	trdno	S6	2,00E ⁻¹⁰	40	—	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
trdno	C7	1	hladen E2	trdno	S7	2,00E ⁻¹¹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻¹¹
trdno	C8	2	hladen E2	trdno	S7	2,00E ⁻¹¹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻¹¹
trdno	C9	3	hladen E2	trdno	S7	2,00E ⁻¹¹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻¹¹
trdno	C10	1	slepi vzorec	slepi vzorec	B1	—	—	160	—	—	160	—
trdno	C11	2	slepi vzorec	slepi vzorec	B2	—	—	160	—	—	160	—
trdno	C12	3	slepi vzorec	slepi vzorec	B3	—	—	160	—	—	160	—
trdno	D1	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E ⁻⁵	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁵
trdno	D2	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E ⁻⁵	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁵
trdno	D3	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E ⁻⁵	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁵
trdno	D4	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E ⁻⁵	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁵
trdno	D5	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E ⁻⁵	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁵
trdno	D6	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E ⁻⁵	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁵

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	D7	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁶
trdno	D8	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁶
trdno	D9	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁶
trdno	D10	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
trdno	D11	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
trdno	D12	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
trdno	E1	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E ⁻⁷
trdno	E2	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E ⁻⁷
trdno	E3	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E ⁻⁷
trdno	E4	1	noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E ⁻⁷
trdno	E5	2	noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E ⁻⁷
trdno	E6	3	noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E ⁻⁷
trdno	E7	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁸
trdno	E8	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁸
trdno	E9	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁸
trdno	E10	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁹

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	E11	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁹
trdno	E12	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁹
trdno	F1	1	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻³	40	—	40	80	160	1,0E ⁻³
trdno	F2	2	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻³	40	—	40	80	160	1,0E ⁻³
trdno	F3	3	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻³	40	—	40	80	160	1,0E ⁻³
trdno	F4	1	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁴	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁴
trdno	F5	2	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁴	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁴
trdno	F6	3	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁴	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁴
trdno	F7	1	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁵	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁵
trdno	F8	2	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁵	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁵
trdno	F9	3	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁵	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁵
trdno	F10	1	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
trdno	F11	2	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
trdno	F12	3	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
trdno	G1	1	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁷	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁷
trdno	G2	2	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁷	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁷
trdno	G3	3	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁷	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁷
trdno	G4	1	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁸	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁸
trdno	G5	2	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁸	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁸
trdno	G6	3	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁸	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁸
trdno	G7	1	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁹

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	G8	2	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁹
trdno	G9	3	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻⁹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁹
trdno	G10	1	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻¹⁰	40	—	40	—	160	1,0E ⁻¹⁰
trdno	G11	2	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻¹⁰	40	—	40	—	160	1,0E ⁻¹⁰
trdno	G12	3	OTES	NE	OTES	2,00E ⁻¹⁰	40	—	40	—	160	1,0E ⁻¹⁰
trdno	H1	1	vroč	H	H	—	—	—	40	—	40	—
trdno	H2	1	vroč	H	H	—	—	—	40	—	40	—
trdno	H3	1	vroč	H	H	—	—	—	40	—	40	—
trdno	H4	1	vroč	H	H	—	—	—	40	—	40	—
trdno	H5	1	vroč	H	H	—	—	—	40	—	40	—
trdno	H6	1	vroč	H	H	—	—	—	40	—	40	—
trdno	H7	1	kontrola s pufrom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
trdno	H8	1	kontrola s pufrom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
trdno	H9	1	kontrola s pufrom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
trdno	H10	1	kontrola s pufrom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
trdno	H11	1	kontrola s pufrom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
trdno	H12	1	kontrola s pufrom	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Opozoriti je treba, da so ‚vroče‘ jamice med inkubacijo prazne. 40 μl se doda samo za scintilacijsko štetje.

Razporeditev jamic za preskus kompetitivne vezave												
Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μl)	Količina na plošči z razredčinami (μl)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	A1	1	celotna vezava	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	celotna vezava	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	celotna vezava	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	celotna vezava	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	celotna vezava	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	celotna vezava	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	A8	2	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	A9	3	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	A10	1	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	A11	2	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	A12	3	hladen E2 (visok)	NSB	S0	2,00E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	B1	1	preskusna kemikalija 1	TC1	1	2,00E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	B2	2	preskusna kemikalija 1	TC1	1	2,00E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	B3	3	preskusna kemikalija 1	TC1	1	2,00E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	B4	1	preskusna kemikalija 1	TC1	2	2,00E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	B5	2	preskusna kemikalija 1	TC1	2	2,00E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	B6	3	preskusna kemikalija 1	TC1	2	2,00E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	B7	1	preskusna kemikalija 1	TC1	3	2,00E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	B8	2	preskusna kemikalija 1	TC1	3	2,00E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	B9	3	preskusna kemikalija 1	TC1	3	2,00E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	B10	1	preskusna kemikalija 1	TC1	4	2,00E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	B11	2	preskusna kemikalija 1	TC1	4	2,00E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	B12	3	preskusna kemikalija 1	TC1	4	2,00E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶

Razporeditev jamic za preskus kompetitivne vezave

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina na plošči z razredčinami (μl)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	C1	1	preskusna kemikalija 1	TC1	5	2,00E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	C2	2	preskusna kemikalija 1	TC1	5	2,00E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	C3	3	preskusna kemikalija 1	TC1	5	2,00E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	C4	1	preskusna kemikalija 1	TC1	6	2,00E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	C5	2	preskusna kemikalija 1	TC1	6	2,00E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	C6	3	preskusna kemikalija 1	TC1	6	2,00E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	C7	1	preskusna kemikalija 1	TC1	7	2,00E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	C8	2	preskusna kemikalija 1	TC1	7	2,00E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	C9	3	preskusna kemikalija 1	TC1	7	2,00E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	C10	1	preskusna kemikalija 1	TC1	8	2,00E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	C11	2	preskusna kemikalija 1	TC1	8	2,00E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	C12	3	preskusna kemikalija 1	TC1	8	2,00E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	D1	1	preskusna kemikalija 2	TC2	1	2,00E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	D2	2	preskusna kemikalija 2	TC2	1	2,00E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	D3	3	preskusna kemikalija 2	TC2	1	2,00E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	D4	1	preskusna kemikalija 2	TC2	2	2,00E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	D5	2	preskusna kemikalija 2	TC2	2	2,00E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	D6	3	preskusna kemikalija 2	TC2	2	2,00E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	D7	1	preskusna kemikalija 2	TC2	3	2,00E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	D8	2	preskusna kemikalija 2	TC2	3	2,00E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	D9	3	preskusna kemikalija 2	TC2	3	2,00E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	D10	1	preskusna kemikalija 2	TC2	4	2,00E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	D11	2	preskusna kemikalija 2	TC2	4	2,00E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	D12	3	preskusna kemikalija 2	TC2	4	2,00E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶

Razporeditev jamic za preskus kompetitivne vezave

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina na plošči z razredčinami (μl)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	E1	1	preskusna kemikalija 2	TC2	5	2,00E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	E2	2	preskusna kemikalija 2	TC2	5	2,00E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	E3	3	preskusna kemikalija 2	TC2	5	2,00E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	E4	1	preskusna kemikalija 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	E5	2	preskusna kemikalija 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	E6	3	preskusna kemikalija 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	E7	1	preskusna kemikalija 2	TC2	7	2,00E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	E8	2	preskusna kemikalija 2	TC2	7	2,00E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	E9	3	preskusna kemikalija 2	TC2	7	2,00E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	E10	1	preskusna kemikalija 2	TC2	8	2,00E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	E11	2	preskusna kemikalija 2	TC2	8	2,00E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	E12	3	preskusna kemikalija 2	TC2	8	2,00E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	F1	1	preskusna kemikalija 3	TC3	1	2,00E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	F2	2	preskusna kemikalija 3	TC3	1	2,00E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	F3	3	preskusna kemikalija 3	TC3	1	2,00E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	F4	1	preskusna kemikalija 3	TC3	2	2,00E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	F5	2	preskusna kemikalija 3	TC3	2	2,00E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	F6	3	preskusna kemikalija 3	TC3	2	2,00E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	F7	1	preskusna kemikalija 3	TC3	3	2,00E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	F8	2	preskusna kemikalija 3	TC3	3	2,00E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	F9	3	preskusna kemikalija 3	TC3	3	2,00E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	F10	1	preskusna kemikalija 3	TC3	4	2,00E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	F11	2	preskusna kemikalija 3	TC3	4	2,00E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	F12	3	preskusna kemikalija 3	TC3	4	2,00E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶

Razporeditev jamic za preskus kompetitivne vezave

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina na plošči z razredčinami (μl)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	G1	1	preskusna kemikalija 3	TC3	5	2,00E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	G2	2	preskusna kemikalija 3	TC3	5	2,00E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	G3	3	preskusna kemikalija 3	TC3	5	2,00E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	G4	1	preskusna kemikalija 3	TC3	6	2,00E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	G5	2	preskusna kemikalija 3	TC3	6	2,00E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	G6	3	preskusna kemikalija 3	TC3	6	2,00E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	G7	1	preskusna kemikalija 3	TC3	7	2,00E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	G8	2	preskusna kemikalija 3	TC3	7	2,00E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	G9	3	preskusna kemikalija 3	TC3	7	2,00E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	G10	1	preskusna kemikalija 3	TC3	8	2,00E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	G11	2	preskusna kemikalija 3	TC3	8	2,00E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	G12	3	preskusna kemikalija 3	TC3	8	2,00E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	H1	1	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	hladen E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	hladen E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	hladen E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	hladen E2 S			1,00E ⁻⁷	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	hladen E2 S			1,00E ⁻⁷	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	hladen E2 S			1,00E ⁻⁷	40	0	40	80	160	

Dodatek 3

IN VITRO PRESKUS VEZAVE NA ESTROGENSKE RECEPTORJE Z UPORABO ČLOVEŠKEGA REKOMBINANTNEGA PROTEINA ERA Z DOMENO ZA VEZAVO LIGANDOV INSTITUTA CERi (CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE)

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

1. Pri tem *in vitro* preskusu vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave na estrogenske receptorje (ERa) se uporablja domena za vezavo liganda (LBD) človeškega ERa (hrERa). Ta proteinski konstrukt je proizvedel japonski inštitut Chemicals Evaluation Research Institute (CERi), obstaja pa kot fuzijski protein glutation-S-transferaza (GST) in je izražen v *E. coli*. Protokol CERi je bil predmet mednarodne validacijske študije, izvedene več laboratorijih (2), ki je dokazala njegovo ustreznost in zanesljivost za predvideni namen preskusa.
2. Ta preskus je presejalni postopek za opredelitev snovi, ki se lahko vežejo na hrERa. Uporablja se za določitev zmožnosti preskusne kemikalije, da tekmuje s 17 β -estradiolom za vezavo na hrERa-LBD. Rezultati kvantitativne analize lahko vključujejo IC₅₀ (merilo koncentracije preskusne kemikalije, potrebne, da izpodrine polovico [³H]-17 β -estradiola s hrERa) in relativne vezavne afinitete preskusnih kemikalij za hrERa v primerjavi s 17 β -estradiolom. Za namene presejanja kemikalij lahko sprejemljivi rezultati kvalitativne analize vključujejo razvrstitve preskusnih kemikalij kot snovi, ki se vežejo na hrERa, snovi, ki se ne vežejo, ali dvoumne snovi na podlagi meril, opisanih za krivulje vezave.
3. Pri preskusu se uporabi radioaktivno označen ligand, zaradi katerega laboratorij potrebuje dovoljenje za radioaktivne materiale. Vsi postopki z radioizotopi in nevarnimi kemikalijami morajo potekati v skladu s predpisi in postopki, kot so opisani v nacionalni zakonodaji.
4. Pred uporabo tega preskusa za regulativne namene je treba prebrati oddelka **„SPLOŠNI UVOD“** in **„ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER“**. Opredelitve in kratice, uporabljene v tej smernici za preskušanje, so opisane v Dodatku 1.

NAČELA PRESKUSA (GLEJ TUDI SPLOŠNI UVOD)

5. S preskusom vezave na hrERa se meri zmožnost radioaktivno označenega liganda ([³H]17 β -estradiol), da se veže na ER ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije (tj. kompetitorja). Preskusne kemikalije, ki imajo visoko afiniteto do ER, tekmujejo z radioaktivno označenim ligandom pri nižji koncentraciji kot kemikalije z nižjo afiniteto do receptorja.
6. Ta preskus je sestavljen iz dveh večjih delov: poskusa vezave z nasičenjem za opredelitev parametrov interakcije receptor-ligand in nato poskusa kompetitivne vezave ER, za katerega je značilno tekmovanje med preskusno kemikalijo in radioaktivno označenim ligandom za vezavo na ER.
7. Namen poskusa vezave z nasičenjem je opredeliti določeno serijo receptorjev za vezavno afiniteto in število vezav kot pripravo na poskus kompetitivne vezave. S poskusom vezave z nasičenjem se v pogojih stacionarnega stanja merita afiniteta stalne koncentracije estrogenskega receptorja do njegovega naravnega liganda (ki jo predstavlja disociacijska konstanta, Kd) in koncentracija aktivnih receptorskih mest (B_{max}).
8. S poskusom kompetitivne vezave se meri afiniteta snovi, da tekmuje s [³H]17 β -estradiolom za vezavo na ER. Afiniteta je kvantificirana s koncentracijo preskusne kemikalije, ki v stacionarnem stanju zavre 50 % specifične vezave [³H]17 β -estradiola (tako imenovana inhibicijska koncentracija 50 % ali IC₅₀). To se lahko oceni tudi na podlagi relativne vezavne afinitete (RBA glede na IC₅₀ estradiola, merjeno ločeno v isti ponovitvi). S poskusom kompetitivne vezave se meri vezava [³H]17 β -estradiola pri stalni koncentraciji v prisotnosti širokega razpona (osem redov velikosti) koncentracij preskusne kemikalije. Če je mogoče, se nato podatki prilagodijo obliki Hillove enačbe (Hill, 1910), ki opisuje izpodrinjenje radioaktivno označenega liganda s kompetitivno snovjo, ki se veže na eno mesto. Glede na obseg izpodrinjenja radioaktivno označenega estradiola v stacionarnem stanju se preskusna kemikalija opredeli kot snov, ki se veže, snov, ki se ne veže, ali snov, ki povzroči dvoumen odziv.

POSTOPEK

Dokazovanje sprejemljive učinkovitosti proteina hrERα

9. Pred rednim izvajanjem preskusov vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave je treba za vsako novo serijo hrERα dokazati pravilno delovanje v laboratoriju, v katerem bo uporabljena. Za dokaz učinkovitosti je treba uporabiti postopek v dveh korakih. Ta koraka sta naslednja:

- izvedite preskus vezave z nasičenjem [³H]-17β-estradiola, da dokažete specifičnost in nasičenje hrERα. Analiza teh podatkov z nelinearno regresijo (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) in dobljeni Scatchardov diagram morata dokumentirati vezavno afiniteto hrERα [³H]-17β-estradiola (K_d) in število receptorjev (B_{max}) za določeno serijo hrERα;
- izvedite preskus kompetitivne vezave z uporabo kontrolnih snovi (referenčnega estrogena (17β-estradiola), snovi, ki se veže šibko (npr. noretinodrela ali noretindrona), in snovi, ki se ne veže (oktiltrietoksisilana, OTES). Vsak laboratorij mora vzpostaviti zbirko podatkov iz preteklih preskusov, da dokumentira skladnost IC₅₀ in ustreznih vrednosti za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko, med poskusi in različnimi serijami hrERα. Poleg tega morajo biti parametri krivulj kompetitivne vezave za kontrolne snovi v mejah 95-odstotnega intervala zaupanja (glej preglednico 1), ki so bile določene na podlagi podatkov laboratorijev, sodelujočih v validacijski študiji za ta preskus (2).

Preglednica 1

Merila za učinkovitost, razvita za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko, preskus vezave na hrER organizacije CERi

Snov	Parameter	Srednja vrednost ^(a)	Standardni odklon (n)	95-odstotni intervali zaupanja ^(b)	
				Spodnja meja	Zgornja meja
17β-estradiol	Vrh	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Dno	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hillov naklon	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	LogIC ₅₀	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Noretinodrel	Vrh	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Dno	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hillov naklon	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	LogIC ₅₀	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Noretindron ^(c)	Vrh	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Dno	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillov naklon	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	LogIC ₅₀	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

^(a) Srednja vrednost ± standardni odklon (SD) z velikostjo vzorca (n) sta bila izračunana na podlagi ocen prileganja krivulj (4-parametrna Hillova enačba) za kontrolne ponovitve, izvedene v štirih laboratorijih med validacijsko študijo (glej Prilogo N k viru 2).

^(b) Pri merilih za sprejemljivost so kot vodilo navedeni 95-odstotni intervali zaupanja.

^(c) Preskušanje noretindrona za podnalogo 4 med validacijsko študijo ni bilo obvezno (glej vir 2, podnalogo 4). Tako sta bila srednja vrednost ± standardni odklon (SD) (n) izračunana na podlagi ocen prileganja krivulj (4-parametrna Hillova enačba) za kontrolne ponovitve, izvedene v dveh laboratorijih.

Razpon IC₅₀ je odvisen od K_d pripravka receptorja in koncentracije radioaktivno označenega liganda, uporabljenih v vsakem laboratoriju. Dopustna je ustrezna prilagoditev razpona IC₅₀ na podlagi pogojev, uporabljenih za izvedbo preskusa.

Dokazovanje usposobljenosti laboratorija

10. Glej odstavka 17 in 18 ter preglednico 2 v oddelku **‘ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER’** te preskusne metode. Vsak preskus (vezava z nasičenjem in kompetitivna vezava) morajo sestavljati tri neodvisne ponovitve (tj. s svežimi razredčinami receptorja, kemikalij in reagentov) na različne dneve, vsaka ponovitev pa mora vsebovati tri ponovljene vzorce.

Določitev koncentracije receptorja (hrER α)

11. Koncentracija aktivnega receptorja se nekoliko razlikuje glede na serijo in pogoje shranjevanja. Iz tega razloga je treba določiti koncentracijo aktivnega receptorja, kot se prejme od dobavitelja. Tako se dobi ustrezna koncentracija aktivnega receptorja ob ponovitvi.
12. V pogojih, ki ustrezajo kompetitivni vezavi (tj. 0,5 nM [3 H]-17 β -estradiola), je treba nominalne koncentracije 0,1, 0,2, 0,4 in 0,6 nM receptorja inkubirati v odsotnosti (celotna vezava) in prisotnosti (nespecifična vezava) 1 μ M neoznačenega estradiola. Specifična vezava, izračunana kot razlika med skupno in nespecifično vezavo, se grafično prikaže v odvisnosti od nominalne koncentracije receptorja. Koncentracija receptorja, pri kateri vrednosti specifične vezave ustrezajo 40 % dodanega izotopskega označevalca, se poveže z ustrezno koncentracijo receptorja, in to koncentracijo receptorja je treba uporabiti za poskuse vezave z nasičenjem in kompetitivne vezave. Pogosto temu pogoju ustreza končna koncentracija hrER, ki znaša 0,2 nM.
13. Če merila 40 % večkrat ni mogoče izpolniti, je treba preveriti morebitne napake v zasnovi poskusa. Neizpolnitev merila 40 % lahko nakazuje, da je v rekombinantni seriji zelo malo aktivnega receptorja, zato je treba razmisliti o uporabi druge serije receptorja.

Preskus z nasičenjem

14. Osem naraščajočih koncentracij [3 H]17 β -estradiola je treba oceniti v treh ponovitvah v naslednjih treh pogojih (glej preglednico 2):
 - a. v odsotnosti neoznačenega 17 β -estradiola in prisotnosti ER. To je določitev celotne vezave z merjenjem radioaktivnosti v jamicah, v katerih je samo [3 H]17 β -estradiol;
 - b. v prisotnosti 2000-kratne presežne koncentracije neoznačenega 17 β -estradiola v primerjavi z označenim 17 β -estradiolom in prisotnosti ER. Namen tega pogoja je nasičiti aktivna vezavna mesta z neoznačenim 17 β -estradiolom in z merjenjem radioaktivnosti v jamicah določiti nespecifično vezavo. Za ves preostali vroči estradiol, ki se lahko veže na receptor, se šteje, da se veže na nespecifično mesto, saj mora biti koncentracija hladnega estradiola tako visoka, da je vezan na vsa razpoložljiva specifična mesta na receptorju;
 - c. v odsotnosti neoznačenega 17 β -estradiola in odsotnosti ER (določitev skupne radioaktivnosti).

Priprava raztopin [3 H]-17 β -estradiola in neoznačenega 17 β -estradiola ter hrER α

15. 40 nM raztopine [3 H]-17 β -estradiola je treba pripraviti iz 1 μ M osnovne raztopine [3 H]-17 β -estradiola v DMSO, tako da se pri sobni temperaturi dodata DMSO (za pripravo koncentracije, ki znaša 200 nM) in analizni pufer (za pripravo koncentracije, ki znaša 40 nM). Z uporabo te raztopine s koncentracijo 40 nM se pripravijo serije razredčine [3 H]-17 β -estradiola, ki segajo od 0,313 nM do 40 nM, z analiznim pufrom pri sobni temperaturi (kot je prikazano v vrstici 12 preglednice 2). Končne preskusne koncentracije, ki segajo od 0,0313 do 4,0 nM, se dobijo z dodajanjem 10 μ l teh raztopin v zadevne preskusne jamice na 96-jamični mikrotitrski plošči (glej preglednici 2 in 3). Priprava analiznega puffra, izračun prvotne osnovne raztopine [3 H]-17 β -estradiola na podlagi njegovega specifičnega delovanja, priprava razredčin in določitev koncentracij so podrobno opisani v protokolu CERI (2).

16. Razredčine raztopin neoznačenega 17 β -estradiola je treba pripraviti iz 1 nM osnovne raztopine 17 β -estradiola z dodajanjem analiznega pufru, da se dobi osem naraščajočih koncentracij, ki prvotno segajo od 0,625 μ M do 80 μ M. Končne preskusne koncentracije, ki segajo od 0,0625 μ M do 8 μ M, se dobijo z dodajanjem 10 μ l teh raztopin v zadevne preskusne jamice na 96-jamični mikrotitrski plošči, namenjeni meritvi nespecifične vezave (glej preglednici 2 in 3). Priprava razredčin neoznačenega 17 β -estradiola je podrobno opisana v protokolu CERI (2).
17. Uporabiti je treba koncentracijo receptorja, ki daje 40 ± 10 % specifične vezave (glej odstavka 12 in 13). Raztopino hrERa je treba pripraviti z ledeno mrzlim analiznim pufrom neposredno pred uporabo, tj. ko so pripravljene vse jamice za celotno vezavo, nespecifično vezavo in samo vroči ligand.
18. 96-jamične mikrotitrške plošče se pripravijo, kot je prikazano v preglednici 2, s tremi ponovljenimi vzorci na koncentracijo [3 H]-17 β -estradiola. Dodelitev količine [3 H]-17 β -estradiola, neoznačenega 17 β -estradiola, pufru in receptorja je navedena v preglednici 3.

Preglednica 2

Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus vezave z nasičenjem

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Za meritev TB			Za meritev NSB			Za določitev samo vročega liganda				Razredčine neoznačenega E2 za stolpec plošče 4–6	Razredčine [3 H]E2 za stolpec plošče 1–9
A	0,0313 nM [3 H] E2+ ER			0,0313 nM [3H] E2+ 0,0625 μ M E2+ ER			0,0313 nM				0,625 μ M	0,313 nM
B	0,0625 nM [3 H] E2+ ER			0,0625 nM [3H] E2+ 0,125 μ M E2+ ER			0,0625 nM				1,25 μ M	0,625 nM
C	0,125 nM [3 H] E2+ ER			0,125 nM [3H] E2+ 0,25 μ M E2+ ER			0,125 nM				2,5 μ M	1,25 nM
D	0,250 nM [3 H] E2+ ER			0,250 nM [3H] E2+ 0,5 μ M E2+ ER			0,250 nM				5 μ M	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [3H] E2+ 1 μ M E2+ ER			0,50 nM				10 μ M	5 nM
F	1,00 nM [3 H] E2+ ER			1,00 nM [3H] E2+ 2 μ M E2+ ER			1,00 nM				20 μ M	10 nM
G	2,00 nM [3 H] E2+ ER			2,00 nM [3H] E2+ 4 μ M E2+ ER			2,00 nM				40 μ M	20 nM
H	4,00 nM [3 H] E2+ ER			4,00 nM [3H] E2+ 8 μ M E2+ ER			4,00 nM				80 μ M	40 nM

TB: celotna vezava.

NSB: nespecifična vezava.

[3 H] E2: [3 H]-17 β -estradiolE2: neoznačen 17 β -estradiol.

(*) Navedene koncentracije so v tem primeru končne koncentracije v vsaki jamici.

(**) Razredčine neoznačenega E2 in [3 H]E2 se lahko pripravijo na drugi plošči.

Preglednica 3

Količine reagenta na mikrotitrski plošči za nasičenje

Številka vrstice		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Koraki priprave		Jamice za TB			Jamice za NSB			Samo vroč ligand		
Količina elementov za zgornje reakcijske jamice in vrstni red dodajanja	Pufer	60 µl			50 µl			90 µl		
	neoznačen E2 iz vrstice 11 v preglednici 2	–			10 µl			–		
	[3H]E2 iz vrstice 12 v preglednici 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			–		
Skupna reakcijska količina		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubacija		REAKCIJA PO 2-URNI INKUBACIJI						Kvantifikacija radioaktivnosti takoj po pripravi. Brez inkubacije		
Tretiranje z 0,4-odstotnim DCC		da			da			ne		
Količina 0,4-odstotnega DCC		100 µl			100 µl			–		
Filtracija		da			da			ne		
MERJENJE RAZGRADENJ NA MINUTO (DPMS)										
Količina za kvantifikacijo, dodana scintilacijski zmesi		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Če se za merjenje dpms uporablja tekočinsko scintilacijsko štetje za mikrotitrne plošče, priprava samo vročega liganda na isti preskusni plošči z jamicami s TB in NSB ni ustrezna. Samo vroči ligand je treba pripraviti na drugi plošči.

(**) Če se za ločevanje DCC uporabi centrifugiranje, je treba 50 µl supernatanta meriti s tekočinskim scintilacijskim štetjem, da se prepreči kontaminacija DCC.

19. Preskusne mikrotitrne plošče za določitev celotne vezave in nespecifične vezave je treba dve uri inkubirati pri sobni temperaturi (22–28 °C).

Meritev [³H]-17β-estradiola, vezanega na hrERa

20. Po dvourni inkubaciji je treba [³H]-17β-estradiol, vezan na hrERa, ločiti od prostega [³H]-17β-estradiola, tako da se v jamice doda 100 µl ledeno mrzle raztopine 0,4-odstotnega DCC. Plošče je treba nato za 10 minut postaviti na led, reakcijsko zmes in raztopino DCC pa filtrirati, tako da se ju prenese na filter za mikrotitrne plošče, da se odstrani DCC. Nato je treba v scintilacijsko tekočino v vialah za tekočinsko scintilacijsko štetje dodati 100 µl filtrata, da se s tekočinskim scintilacijskim štetjem določi razgradnja na minuto (dpms) na vialo.

21. Če filter za mikrotitrsko ploščo ni na voljo, se lahko DCC odstrani tudi s centrifugiranjem. S 50 µl supernatanta, ki vsebuje na hrERa vezan [³H]-17β-estradiol, je treba ravnati nadvse previdno, da se prepreči kontaminacija jamic z dotikanjem DCC, in ga je treba uporabiti za scintilacijsko štetje.

22. Pogoji s samo vročim ligandom se uporabijo za določitev razgradnje na minuto (dpm) za [^3H]-17 β -estradiol, dodan v preskusne jamice. Radioaktivnost je treba kvantitativno določiti takoj po pripravi. Jamice se ne smejo inkubirati in ne smejo biti tretirane z raztopino DCC, temveč je treba njihovo vsebino dodatni neposredno scintilacijski tekočini. Te meritve pokažejo, koliko [^3H]-17 β -estradiola v razgradnjah na minuto je bilo dodanega vsakemu nizu jamic za celotno vezavo in nespecifično vezavo.

Preskus kompetitivne vezave

23. S preskusom kompetitivne vezave se meri vezava ene same koncentracije [^3H]-17 β -estradiola ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije. Za vsako koncentracijo je treba pri eni ponovitvi uporabiti tri sočasne ponovljene vzorce. Poleg tega je treba za vsako kemikalijo, ki se preskuša, izvesti tri nesočasne ponovitve. Preskus je treba zasnovati na eni ali več 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah.

Kontrole

24. Pri izvajanju preskusa je treba v vsak poskus sočasno vključiti topilo in kontrole (tj. referenčni estrogen, snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Na eni plošči je treba med vsako ponovitvijo uporabiti celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole (tj. snov, ki se veže šibko, in snov, ki se ne veže). Vse druge plošče morajo vsebovati (i) visoko (največje izpodrinjenje, tj. približno popolno izpodrinjenje radioaktivno označenega liganda) in srednjo (približno IC_{50}) koncentracijo E2 in snovi, ki se veže šibko, v treh ponovitvah; (ii) kontrolo s topilom in nespecifično vezavo, vsako v treh ponovitvah. Postopki za pripravo analiznega pufra, kontrol, [^3H]-17 β -estradiola, hrERa in raztopin preskusne kemikalije so podrobno opisani v protokolu CERI (2).

Kontrola s topilom

25. Kontrola s topilom pokaže, da topilo ne reagira s preskusnim sistemom, in poleg tega meri celotno vezavo (TB). Priporočeno topilo je DMSO. Če pa najvišja koncentracija preskusne kemikalije ni topna v DMSO, se lahko uporabi etanol. Koncentracija DMSO v končnih preskusnih jamicah mora biti 2,05 % in se lahko v primeru premajhne topnosti preskusne kemikalije poviša 2,5 %. Koncentracije DMSO nad 2,5 % se ne smejo uporabiti zaradi interference višjih koncentracij topila s preskusom. Za preskusne kemikalije, ki niso topne v DMSO, topne pa so v etanolu, se lahko brez interference v preskusu uporabi največ 2-odstotni etanol.

Kontrola s pufrom

26. Kontrola s pufrom (BC) ne sme vsebovati niti topila niti preskusne kemikalije, pač pa mora vsebovati vse druge elemente preskusa. Rezultati kontrole s pufrom se primerjajo s kontrolo s topilom, da se potrdi, da uporabljeno topilo ne vpliva na preskusni sistem.

Snov, ki se veže močno (referenčni estrogen)

27. 17 β -estradiol (CAS 50-28-2) je endogeni ligand in se z visoko afiniteto veže na ER, podtip alfa. Za vsak preskus kompetitivne vezave na hrERa je treba z uporabo neoznačenega 17 β -estradiola pripraviti standardno krivuljo, da se omogoči ocena variabilnosti, ko se preskus v daljšem časovnem obdobju izvaja v istem laboratoriju. Osem raztopin neoznačenega 17 β -estradiola je treba pripraviti v DMSO in analiznem pufu, pri čemer končne koncentracije v preskusnih jamicah, ki jih je treba uporabiti, segajo od 100 nM do 10 pM (od $-7\backslash[\log\text{M}]$ do $-11\backslash[\log\text{M}]$), razporejene pa so tako: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , $10^{-8,5}$, 10^{-9} , $10^{-9,5}$, 10^{-10} , 10^{-11} M. Najvišja koncentracija neoznačenega 17 β -estradiola (1 μM) se mora uporabiti kot indikator nespecifične vezave. Ta koncentracija je v preglednici 4 označena kot „NSB“, čeprav je tudi del standardne krivulje.

Snov, ki se veže šibko

28. Vključiti je treba snov, ki se veže šibko (noretinodrel (CAS68-23-5) ali namesto njega noretindron (CAS 68-22-4)), da se dokaže občutljivost vsakega poskusa in omogoči ocena variabilnosti pri izvajanju preskusa v daljšem časovnem obdobju. Osem raztopin snovi, ki se veže šibko, je treba pripraviti v DMSO in analiznem pufu, pri čemer končne koncentracije v preskusnih jamicah znašajo: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6} , $10^{-6,5}$, 10^{-7} , $10^{-7,5}$, 10^{-8} in 10^{-9} M.

Snov, ki se ne veže

29. Kot negativno kontrolo (snov, ki se ne veže) je treba uporabiti oktiltrietoksisilan (OTES, CAS 2943-75-1). Ta zagotavlja, da se s preskusom, kot je izveden, zaznajo preskusne kemikalije, ki se ne vežejo na hrERa. Osem raztopin snovi, ki se ne veže, je treba pripraviti v DMSO in analiznem pufru, pri čemer končne koncentracije v preskusnih jamicah znašajo: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M. Kot nadomestna snov, ki se ne veže, se lahko uporabi di-n-butil ftalat (DBP, CAS 84-72-2), vendar se lahko preskusi samo do koncentracije 10^{-4} M. Dokazano je bilo, da največja topnost DBP v preskusu znaša 10^{-4} M.

Koncentracija hrERa

30. Uporabiti je treba količino receptorja, ki daje $40 \pm 10\%$ specifične vezave (glej odstavek 12 in 13 Dodatka 3). Raztopino hrERa je treba pripraviti z redčenjem funkcionalne hrERa v ledeno mrzlem analiznem pufru neposredno pred uporabo.

[^3H]-17 β -estradiol

31. Končna koncentracija [^3H]-17 β -estradiola v preskusnih jamicah mora znašati 0,5 nM.

Preskusne kemikalije

32. Najprej je treba izvesti preskus topnosti, da se določi meja topnosti za vsako preskusno kemikalijo in opredeli ustrezno območje koncentracije, ki se uporabi pri izvajanju preskusnega protokola. Mejo topnosti vsake preskusne kemikalije je treba najprej določiti v topilu in nato dodatno potrditi v pogojih preskusa. Končna koncentracija, preskušena v preskusu, ne sme presegati 1 mM. Preskušanje z določanjem območja vključuje kontrolo s topilom in vsaj osem logaritemskih zaporednih razredčin, ki se začnejo pri najvišji dopustni koncentraciji (npr. 1 mM ali manj, odvisno od meje topnosti), ter evidentiranje morebitne motnosti ali oborine (glej tudi odstavek 35 Dodatka 3). Ko je določeno območje koncentracije za preskušanje, je treba preskusno kemikalijo preskusiti z uporabo osmih logaritemskih koncentracij v ustreznih intervalih, kot je opredeljeno s predhodnim preskusom za določanje območja. Koncentracije, preskušene pri drugem in tretjem poskusu, je treba dodatno ustrezno prilagoditi, da se bolje izrazi krivulja odziva na koncentracijo, če je potrebno.
33. Razredčine preskusne kemikalije je treba pripraviti v ustreznem topilu (glej odstavek 25 Dodatka 3). Če najvišja koncentracija preskusne kemikalije ni topna v DMSO ali etanolu, z dodajanjem več topila pa bi koncentracija topila v končni epruveti presegla dopustno mejo, se lahko najvišja koncentracija zniža na naslednjo nižjo koncentracijo. V tem primeru se lahko dodatna koncentracija doda na spodnjem koncu niza koncentracij. Preostale koncentracije v nizu morajo ostati nespremenjene.
34. Raztopine preskusne kemikalije je treba ob dodajanju v preskusno jamico pazljivo spremljati, saj lahko preskusna kemikalija ob dodajanju v preskusno jamico obori. Podatke za vse jamice, ki vsebujejo oborino, je treba izključiti iz prileganja krivulje in navesti razlog za izključitev.
35. Če obstajajo predhodne informacije iz drugih virov, ki zagotavljajo $\log(\text{IC}_{50})$ preskusne kemikalije, je morda ustrezno, da se razredčine geometrično razporedijo bližje okrog pričakovanega $\log(\text{IC}_{50})$ (tj. 0,5 logaritemske enote). Iz končnih rezultatov mora biti razvidna zadostna razpršenost koncentracij na obeh straneh $\log(\text{IC}_{50})$, vključno z zgornjo in spodnjo stranjo, tako da je mogoče ustrezno opredeliti krivuljo vezave.

Razporeditev na preskusni plošči

36. Pripravi je treba označene mikrotitrne plošče, tako da se uporabijo šestkratne inkubacije za kontrolo s topilom, najvišja koncentracija referenčnega estrogena (E2), ki se uporablja tudi kot indikator nespecifične vezave (NSB), kontrola s pufrom, trikratne inkubacije za vsako od osmih koncentracij kontrole s snovjo, ki se ne veže (oktil-trietoksisilan), sedem nižjih koncentracij referenčnega estrogena (E2), osem koncentracij snovi, ki se veže šibko (noretinodrel ali noretindron), in osem koncentracij vsake preskusne kemikalije (TC). Primer diagrama razporeditve na plošči za celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole je naveden v preglednici 4 v nadaljevanju. Dodatne mikrotitrne plošče se uporabijo za preskusno kemikalijo in morajo vsebovati kontrole plošč, tj. (i) visoko (največje izpodrinjenje) ter srednjo (približno IC_{50}) koncentracijo E2 in snovi, ki se veže šibko, v treh ponovitvah; (ii) kontrolo s topilom (kot celotno vezavo) in nespecifično vezavo, vsako v šestih ponovitvah (preglednica 5). Primer delovnega lista z razporeditvijo na mikrotitrski plošči za kompetitivni preskus z uporabo treh neznanih preskusnih kemikalij je naveden v Dodatku 3.3. Koncentracije, navedene na delovnem listu ter v preglednicah 4 in 5, se nanašajo na končne koncentracije, uporabljene v vsaki preskusni jamici. Največja koncentracija za E2 mora biti 1×10^{-7} M, za snov, ki se veže šibko, pa je treba uporabiti najvišjo koncentracijo, uporabljeno za snov, ki se veže šibko, na plošči 1. Koncentracijo IC_{50} mora določiti laboratorij na podlagi svoje zbirke podatkov o kontrolah iz preteklih preskusov. Pričakuje se, da bo ta vrednost podobna tisti iz validacijskih študij (glej preglednico 1).

Preglednica 4

Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus kompetitivne vezave ⁽¹⁾ ⁽²⁾, celotne krivulje koncentracije za referenčni estrogen in kontrole (plošča 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Kontrola s pufrom in pozitivna kontrola (E2)			Šibka pozitivna (noretinodrel)			Negativna kontrola (OTES)			TB in NSB		
A	Slepi vzorec (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (kontrola s topilom) (2,05-odstotni DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1 \times 10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1 \times 10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Kontrola s pufrom		
F	E2 ($1 \times 10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1 \times 10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Slepi vzorec (za vroče) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1 \times 10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

⁽¹⁾ Priprava vzorca za mikrotitrsko ploščo s standardi, ki jo je treba uporabiti pri vsakem poskusu.

⁽²⁾ Opozoriti je treba, da to mikrotitrsko ploščo sestavljajo razredčine, pripravljene na plošči za razredčine, opisani za standarde v prejšnjih oddelkih.

V tem primeru je snov, ki se veže šibko, noretinodrel (NE).

(*) Dejanski slepi vzorec, jamica se ne uporablja.

(**) Slepi vzorec se ne uporablja med inkubacijo, temveč se uporabi za potrditev skupne dodane radioaktivnosti.

Preglednica 5

Razporeditev na mikrotitrski plošči za preskus kompetitivne vezave, dodatne plošče za preskusne kemikalije (TC) in kontrole plošč

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Preskusna kemikalija-1 (TC-1)			Preskusna kemikalija-2 (TC-2)			Preskusna kemikalija-3 (TC-3)			Kontrole		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC ₅₀)		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$ M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC ₅₀)		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (kontrola s topilom)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

V tem primeru je snov, ki se veže šibko, noretinodrel (NE).

Dokončanje preskusa kompetitivne vezave

37. Razen v jamice za celotno vezavo in slepe vzorce (za vroče), kot je prikazano v preglednici 6, je treba v vsako jamico dodati 50 μ l analiznega pufru in ga zmešati z 10 μ l kontrole s topilom, referenčnega estrogena (E2), snovi, ki se veže šibko, snovi, ki se ne veže, oziroma preskusnih kemikalij, 10 μ l raztopine [3 H]-17 β -estradiola s koncentracijo 5 nM. Nato se na vsako ploščo doda 30 μ l ledeno mrzle receptorske raztopine in narahlo premeša. Raztopina hrERa mora biti zadnji dodani reagent. Preskusne mikrotitrne plošče je treba dve uri inkubirati pri sobni temperaturi (22–28 °C).

Preglednica 6

Količina preskusnih elementov za preskus kompetitivne vezave hrER, mikrotitrne plošče

Koraki priprave		Jamice, razen tistih s TB	Jamice s TB	Slepi vzorec (za vroče)
Količina elementov za zgornje reakcijske jamice in vrstni red dodajanja	analizni pufer pri sobni temperaturi	50 μ l	60 μ l	90 μ l
	neoznačen E2, snov, ki se veže šibko, snov, ki se ne veže, topilo in preskusne kemikalije (*)	10 μ l	—	—
	[3 H]-17 β -estradiol, da se dobi končna koncentracija 0,5 nM (tj. 5 nM)	10 μ l	10 μ l	10 μ l
	koncentracija hrERa, kot je določena (glej odstavka 12 in 13)	30 μ l	30 μ l	—
Skupna količina v vsaki preskusni jamici		100 μ l	100 μ l	100 μ l

(*) Ustrezno pripravljeno, da se dobi končna koncentracija znotraj dopustne koncentracije topila.

38. Nato je treba izvesti kvantifikacijo [^3H]-17 β -estradiola, vezanega na hrER α , po ločevanju [^3H]-17 β -estradiola, vezanega na hrER α , od prostega [^3H]-17 β -estradiola, tako da se v vsako jamico doda 100 μl ledeno mrzle raztopine DCC, kot je opisano v odstavkih 21–23 Dodatka 3 za preskus vezave z nasičenjem.
39. Jamice G10–12 in H10–12 (v preglednici 4 opredeljene kot slepi vzorec (za vroče)) predstavljajo razgradnje na minuto [^3H]-označenega-estradiola v 10 μl . 10 μl alikvota je treba dodati neposredno scintilacijski tekočini.

Merila za sprejemljivost

Preskus vezave z nasičenjem

40. Krivulja specifične vezave mora doseči stacionarno stanje, ko se uporabijo naraščajoče koncentracije [^3H]-17 β -estradiola, kar kaže na nasičenje hrER α z ligandom.
41. Specifična vezava pri 0,5 nM [^3H]-17 β -estradiola mora biti znotraj sprejemljivega razpona 30–50 % povprečne izmerjene skupne radioaktivnosti, dodane med ponovitvami. Občasni rahli odmiki od tega razpona so dopustni, če pa so ponovitve stalno zunaj tega razpona ali je posamezna ponovitev precej zunaj tega razpona, je treba koncentracijo proteina prilagoditi in preskus z nasičenjem ponoviti.
42. Podatki morajo dati linearen Scatchardov diagram.
43. Nespecifična vezava ne sme biti prevelika. Vrednost za nespecifično vezavo mora običajno znašati < 35 % celotne vezave. Če se meri zelo nizka razgradnja na minuto za najnižjo koncentracijo radioaktivno označenega preskušene 17 β -estradiola, pa lahko količnik to mejno vrednost občasno preseže.

Preskus kompetitivne vezave

44. Naraščajoče koncentracije neoznačenega 17 β -estradiola morajo izpodriniti [^3H]-17 β -estradiol z receptorja na način, ki je skladen s kompetitivno vezavo na eno mesto.
45. Vrednost IC_{50} za referenčni estrogen (tj. 17 β -estradiol) mora biti približno enaka molški koncentraciji [^3H]-17 β -estradiola in K_d , določenemu na podlagi preskusa vezave z nasičenjem.
46. Celotna specifična vezava mora biti dosledno znotraj sprejemljivega razpona $40 \pm 10\%$, če je povprečna izmerjena koncentracija skupne radioaktivnosti, dodane vsaki jamici, med ponovitvami znašala 0,5 nM. Občasni rahli odmiki od tega razpona so dopustni, če pa so ponovitve stalno zunaj tega razpona ali je posamezna ponovitev precej zunaj tega razpona, je treba koncentracijo proteina prilagoditi.
47. Topilo ne sme spremeniti občutljivosti ali obnovljivosti preskusa. Rezultati kontrole s topilom (jamice TB) se primerjajo s kontrolo s pufrom, da se potrdi, da uporabljeno topilo ne vpliva na preskusni sistem. Če ni učinkov topila na preskus, morajo biti rezultati TB in kontrole s pufrom primerljivi.
48. Snov, ki se ne veže, ne sme izpodriniti več kot 25 % [^3H]-17 β -estradiola s hrER α , ko se preskusi do 10^{-3} M (OTES) ali 10^{-4} M (DBP).

49. Merila za učinkovitost so bila razvita za referenčni estrogen in dve snovi, ki se vežeeta šibko (npr. noretinodrel, noretindron), pri čemer so bili uporabljeni podatki iz validacijske študije za preskus vezave na hrER organizacije CERI (Priloga N k viru 2). 95-odstotni intervali zaupanja so določeni za srednjo vrednost $\pm$ standardni odklon (SD) (n) vseh kontrolnih ponovitev v štirih laboratorijih, ki so sodelovali v validacijski študiji. 95-odstotni intervali zaupanja so bili izračunani so bili za parametre prileganja krivulje (tj. vrh, dno, Hillov naklon, $\log IC_{50}$) za referenčni estrogen in snovi, ki se vežejo šibko, ter $\log_{10}RBA$ snovi, ki se vežejo šibko, glede na referenčni estrogen. V preglednici 1 so določeni pričakovani razponi za parametre prileganja krivulje, ki se lahko uporabijo kot merila za učinkovitost. V praksi se lahko razpon IC_{50} nekoliko razlikuje, odvisno od eksperimentalno izpeljanega Kd pripravka receptorja in koncentracije liganda, ki se uporabi za preskus.
50. Zaradi najrazličnejših obstoječih potencialnih preskusnih kemikalij in razlik v potencialnih afinitetah in rezultatih (npr. celotna krivulja, delna krivulja, brez prileganja krivulje) merila učinkovitosti za parametre prileganja krivulje za preskusne kemikalije niso bila razvita. Vendar je treba pri pregledu rezultatov iz vsake ponovitve za preskusno kemikalijo uporabiti strokovno presojo. Uporabiti je treba dovolj veliko območje koncentracij preskusne kemikalije, da se jasno opredeli vrh (npr. 90–100 % vezave) kompetitivne krivulje. Variabilnost med ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije in med tremi nesočasnimi ponovitvami mora biti mogoče razumno in znanstveno utemeljiti. Kontrole iz vsake ponovitve za preskusno kemikalijo se morajo približati meritvam učinkovitosti, sporočenim za ta preskus CERI, in biti v skladu s podatki posameznega laboratorija o kontrolah iz preteklih preskusov.

ANALIZA PODATKOV

Preskus vezave z nasičenjem

51. Izmerita se celotna vezava in nespecifična vezava. Iz teh vrednosti se izračuna specifična vezava naraščajočih koncentracij $[^3H]$ -17 β -estradiola v pogojih stacionarnega stanja, tako da se nespecifična vezava odšteje od celotne vezave. Graf specifične vezave v odvisnosti od koncentracije $[^3H]$ -17 β -estradiola mora doseči stacionarno stanje za največjo specifično vezavo, značilno za nasičenje hrERa z $[^3H]$ -17 β -estradiolom. Poleg tega je treba z analizo podatkov dokumentirati vezavo $[^3H]$ -17 β -estradiola na eno samo vezavno mesto z visoko afiniteto. Na krivulji vezave z nasičenjem morajo biti prikazane nespecifična, skupna in specifična vezava. Pri nadaljnji analizi teh podatkov je treba uporabiti analizo nelinearne regresije (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) s končnim prikazom podatkov v obliki Scatchardovega diagrama.
52. S podatkovno analizo je treba določiti Bmax in Kd zgolj na podlagi podatkov o celotni vezavi, pri čemer se domneva, da je nespecifična vezava linearna, razen če se utemelji uporaba druge metode. Poleg tega je treba pri določanju najboljšega prileganja uporabiti robustno regresijo, razen če se poda utemeljitev. Navesti je treba izbrano metodo za robustno regresijo. Pri določanju Bmax in Kd na podlagi podatkov o vezavi z nasičenjem je treba vedno uporabiti popravek zaradi izgube liganda (npr. z uporabe metode po Swillensu, 1995).

Preskus kompetitivne vezave

53. Krivulja kompetitivne vezave se izriše kot specifična vezava $[^3H]$ -17 β -estradiola v odvisnosti od koncentracije (enote $\log_{10}$) kompetitorja. Koncentracija preskusne kemikalije, ki zavre 50 % največje specifične vezave $[^3H]$ -17 β -estradiola, je vrednost IC_{50} .
54. Ocene vrednosti $\log(IC_{50})$ za pozitivne kontrole (npr. referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko) je treba določiti z uporabo ustrezne programske opreme za nelinearno prileganje krivulje, da ustreza štiriparametrski Hillovi enačbi (npr. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Vrh, dno, naklon in $\log(IC_{50})$ je treba pri prileganju teh krivulj na splošno pustiti neomejene. Pri določanju najboljšega prileganja je treba uporabiti robustno regresijo, razen če se poda utemeljitev. Popravek zaradi izgube liganda se ne sme uporabiti. Po začetni analizi je treba pregledati vsako krivuljo vezave, da se zagotovi ustrezno prileganje modelu. Relativno vezavno afiniteto (RBA) za snov, ki se veže šibko, je treba izračunati kot delež $\log(IC_{50})$ za snov, ki se veže šibko, v odvisnosti od $\log(IC_{50})$ za 17 β -estradiol. Rezultate iz pozitivnih kontrol in kontrole s snovjo, ki se ne veže, je treba oceniti z uporabo meril za učinkovitost preskusa iz odstavkov 44–49 tega dodatka 3.

55. Podatke za vse preskusne kemikalije je treba analizirati z uporabo stopenjskega pristopa, s čimer se zagotovi, da so podatki ustrezno analizirani in da je vsaka krivulja kompetitivne vezave ustrezno razvrščena. Priporočljivo je, da se v zvezi z vsako ponovitvijo za preskusno kemikalijo sprva izvede standardizirana podatkovna analiza, enaka tisti, ki se uporablja za kontrole z referenčnim estrogenom in snovjo, ki se veže šibko (glej odstavek 54 tega dodatka 3). Ko je ta analiza končana, sta potrebna tehnični pregled parametrov prileganja krivulje in vizualni pregled tega, kako dobro se podatki prilegajo dobljeni krivulji kompetitivne vezave za vsako ponovitev. Med tem tehničnim pregledom so opažanja od koncentracije odvisnega zmanjšanja deleža specifično vezanega [^3H]-17 β -estradiola, nizka variabilnost med tehničnimi ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije in skladnost parametrov prileganja med tremi ponovitvami dober znak, da so bili preskus in podatkovne analize izvedeni pravilno.

Razlaga podatkov

56. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za snov, ki se veže na hrER α , če je krivuljo vezave mogoče prilagoditi in je najnižja točka na krivulji odziva znotraj razpona podatkov pod 50 % (slika 1).

57. Če so izpolnjena vsa merila za sprejemljivost, se preskusna kemikalija šteje za snov, ki se ne veže na hrER α , če:

- je krivuljo vezave mogoče prilagoditi in je najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva znotraj razpona podatkov nad 75 % ali
- krivulje vezave ni mogoče prilagoditi in je najmanjši nezglajeni povprečni delež vezave med skupinami koncentracij v podatkih nad 75 %.

58. Preskusne kemikalije se štejejo za dvoumne, če ni izpolnjen nobeden od zgoraj navedenih pogojev (npr. najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva je med 76 % in 51 %).

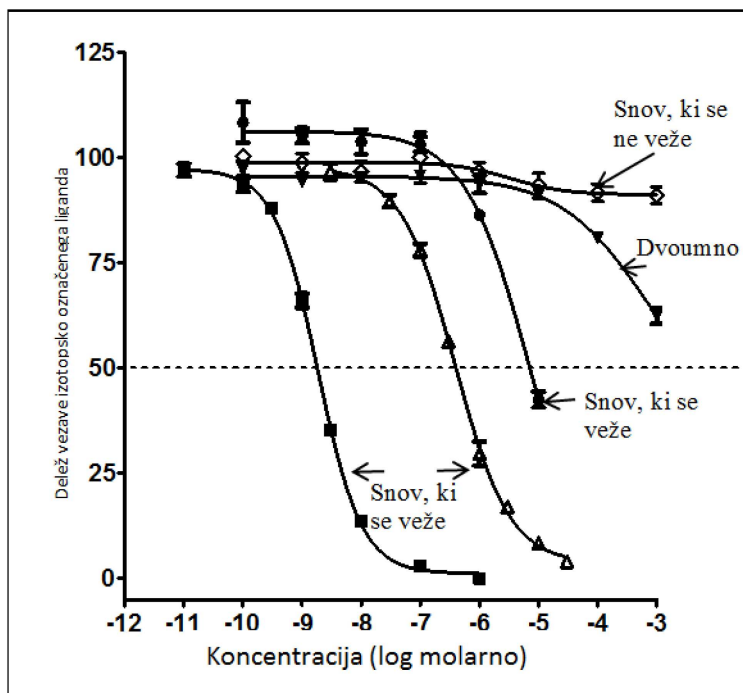
Preglednica 7

Merila za določitev razvrstitve na podlagi krivulje kompetitivne vezave za preskusno kemikalijo

Razvrstitev	Merila
Snov, ki se veže ^a	Krivuljo vezave je mogoče prilagoditi. Najnižja točka na krivulji odziva znotraj razpona podatkov je pod 50 %.
Snov, ki se ne veže ^b	Če je krivuljo vezave mogoče prilagoditi, je najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva znotraj razpona podatkov nad 75 %. Če krivulje vezave ni mogoče prilagoditi, je najmanjši nezglajeni povprečni delež vezave med skupinami koncentracij v podatkih nad 75 %.
Dvoumno ^c	Vsaka preskušena ponovitev, ki ni niti snov, ki se veže, niti snov, ki se ne veže (npr. najnižja točka na prilagojeni krivulji odziva je med 76 % in 51 %).

Slika 1

Primeri razvrstitve preskusne kemikalije z uporabo krivulje kompetitivne vezave



59. V laboratoriju izvedene večkratne ponovitve za preskusno kemikalijo se združijo, tako da se vsaki ponovitvi dodelijo številčne vrednosti in se izračuna povprečje med ponovitvami, kot je prikazano v preglednici 8. Rezultati za združene ponovitve v posameznem laboratoriju se primerjajo s pričakovano razvrstitvijo za vsako preskusno kemikalijo.

Preglednica 8

Metoda za razvrstitev preskusne kemikalije z uporabo večkratnih ponovitev v laboratoriju

Za dodelitev vrednosti vsaki ponovitvi:	
Razvrstitev	Številčna vrednost
Snov, ki se veže	2
Dvoumno	1
Snov, ki se ne veže	0
Za razvrstitev povprečja številčne vrednosti med ponovitvami:	
Razvrstitev	Številčna vrednost
Snov, ki se veže	povprečje $\geq 1,5$
Dvoumno	$0,5 \leq \text{povprečje} < 1,5$
Snov, ki se ne veže	povprečje $< 0,5$

POROČILO O PRESKUSU

60. Glej odstavek 24 v oddelku 'ELEMENTI PRESKUSA VEZAVE NA hrER' te preskusne metode.

Dodatek 3.1

SEZNAM IZRAZOV

[³H]E2: 17β-estradiol, radioaktivno označen s tritijem

DCC: oglje, prevlečeno z dekstranom.

E2: neoznačen 17β-estradiol (inertni).

Analizni pufer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, ki vsebuje 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10-odstotni glicerol, 0,2 mM leupeptina, 1 mM ditiotreitola in 10 mg/ml govejega serumskega albumina.

hrERα: človeški rekombinantni estrogenski receptor alfa (domena za vezavo liganda).

Ponovljeni vzorec: ena od več jamic, ki imajo enako vsebino pri enakih koncentracijah in se preskusijo sočasno v eni sami ponovitvi. V tem protokolu se vsaka koncentracija preskusne kemikalije preskusi v treh ponovitvah; to pomeni, da se pri vsaki koncentraciji preskusne kemikalije sočasno preskusijo trije ponovljeni vzorci.

Ponovitev: celoten sklop jamic pri sočasno izvedenem preskusu z mikrotitrsko ploščo, ki zagotavlja vse potrebne informacije za opredelitev vezave preskusne kemikalije na hrERα (tj. skupni [³H]-17β-estradiol, dodan v preskusno jamico, največja vezava [³H]-17β-estradiola na hrERα, nespecifična vezava in celotna vezava pri različnih koncentracijah preskusne kemikalije). Ponovitev bi lahko sestavljala tudi ena sama preskusna jamica (tj. ponovljeni vzorec) na koncentracijo, ker pa ta protokol zahteva preskušanje v treh ponovitvah, eno ponovitev sestavljajo tri preskusne jamice na koncentracijo. Poleg tega ta protokol zahteva tri neodvisne (tj. nesočasne) ponovitve na kemikalijo.

Dodatek 3.2

RAZPOREDITEV JAMIC ZA PRESKUS KOMPETITIVNE VEZAVE

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	A1	1	slepi vzorec	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
trdno	A2	2	slepi vzorec	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
trdno	A3	3	slepi vzorec	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
trdno	B1	1	hladen E2	trdno	S1	1,00E ⁻¹⁰	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹¹
trdno	B2	2	hladen E2	trdno	S1	1,00E ⁻¹⁰	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹¹
trdno	B3	3	hladen E2	trdno	S1	1,00E ⁻¹⁰	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹¹
trdno	C1	1	hladen E2	trdno	S2	1,00E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
trdno	C2	2	hladen E2	trdno	S2	1,00E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
trdno	C3	3	hladen E2	trdno	S2	1,00E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
trdno	D1	1	hladen E2	trdno	S3	3,16E ⁻⁹	30	50	10	10	100	3,2E ⁻¹⁰
trdno	D2	2	hladen E2	trdno	S3	3,16E ⁻⁹	30	50	10	10	100	3,2E ⁻¹⁰

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	D3	3	hladen E2	trdno	S3	3,16E ⁻⁹	30	50	10	10	100	3,2E ⁻¹⁰
trdno	E1	1	hladen E2	trdno	S4	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
trdno	E2	2	hladen E2	trdno	S4	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
trdno	E3	3	hladen E2	trdno	S4	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
trdno	F1	1	hladen E2	trdno	S5	3,16E ⁻⁸	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁹
trdno	F2	2	hladen E2	trdno	S5	3,16E ⁻⁸	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁹
trdno	F3	3	hladen E2	trdno	S5	3,16E ⁻⁸	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁹
trdno	G1	1	hladen E2	trdno	S6	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
trdno	G2	2	hladen E2	trdno	S6	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
trdno	G3	3	hladen E2	trdno	S6	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
trdno	H1	1	hladen E2	trdno	S7	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
trdno	H2	2	hladen E2	trdno	S7	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
trdno	H3	3	hladen E2	trdno	S7	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	A4	1	noretinodrel	NE	WP1	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
trdno	A5	2	noretinodrel	NE	WP1	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
trdno	A6	3	noretinodrel	NE	WP1	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
trdno	B4	1	noretinodrel	NE	WP2	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
trdno	B5	2	noretinodrel	NE	WP2	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
trdno	B6	3	noretinodrel	NE	WP2	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
trdno	C4	1	noretinodrel	NE	WP3	3,16E ⁻⁷	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁸
trdno	C5	2	noretinodrel	NE	WP3	3,16E ⁻⁷	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁸
trdno	C6	3	noretinodrel	NE	WP3	3,16E ⁻⁷	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁸
trdno	D4	1	noretinodrel	NE	WP4	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
trdno	D5	2	noretinodrel	NE	WP4	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
trdno	D6	3	noretinodrel	NE	WP4	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
trdno	E4	1	noretinodrel	NE	WP5	3,16E ⁻⁶	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁷

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	E5	2	noretinodrel	NE	WP5	$3,16E^{-6}$	30	50	10	10	100	$3,2E^{-7}$
trdno	E6	3	noretinodrel	NE	WP5	$3,16E^{-6}$	30	50	10	10	100	$3,2E^{-7}$
trdno	F4	1	noretinodrel	NE	WP6	$1,00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-6}$
trdno	F5	2	noretinodrel	NE	WP6	$1,00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-6}$
trdno	F6	3	noretinodrel	NE	WP6	$1,00E^{-5}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-6}$
trdno	G4	1	noretinodrel	NE	WP7	$3,16E^{-5}$	30	50	10	10	100	$3,2E^{-6}$
trdno	G5	2	noretinodrel	NE	WP7	$3,16E^{-5}$	30	50	10	10	100	$3,2E^{-6}$
trdno	G6	3	noretinodrel	NE	WP7	$3,16E^{-5}$	30	50	10	10	100	$3,2E^{-6}$
trdno	H4	1	noretinodrel	NE	WP8	$3,16E^{-4}$	30	50	10	10	100	$3,2E^{-5}$
trdno	H5	2	noretinodrel	NE	WP8	$3,16E^{-4}$	30	50	10	10	100	$3,2E^{-5}$
trdno	H6	3	noretinodrel	NE	WP8	$3,16E^{-4}$	30	50	10	10	100	$3,2E^{-5}$
trdno	A7	1	OTES	NE	OTES1	$1,00E^{-9}$	30	50	10	10	100	$1,0E^{-10}$

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	A8	2	OTES	NE	OTES1	1,00E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
trdno	A9	3	OTES	NE	OTES1	1,00E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
trdno	B7	1	OTES	NE	OTES2	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
trdno	B8	2	OTES	NE	OTES2	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
trdno	B9	3	OTES	NE	OTES2	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
trdno	C7	1	OTES	NE	OTES3	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
trdno	C8	2	OTES	NE	OTES3	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
trdno	C9	3	OTES	NE	OTES3	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
trdno	D7	1	OTES	NE	OTES4	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
trdno	D8	2	OTES	NE	OTES4	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
trdno	D9	3	OTES	NE	OTES4	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
trdno	E7	1	OTES	NE	OTES5	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
trdno	E8	2	OTES	NE	OTES5	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	E9	3	OTES	NE	OTES5	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
trdno	F7	1	OTES	NE	OTES6	1,00E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
trdno	F8	2	OTES	NE	OTES6	1,00E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
trdno	F9	3	OTES	NE	OTES6	1,00E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
trdno	G7	1	OTES	NE	OTES7	1,00E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
trdno	G8	2	OTES	NE	OTES7	1,00E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
trdno	G9	3	OTES	NE	OTES7	1,00E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
trdno	H7	1	OTES	NE	OTES8D-BP7	1,00E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
trdno	H8	2	OTES	NE	OTES88	1,00E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
trdno	H9	3	OTES	NE	OTES8	1,00E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
trdno	A10	1	celotna vezava	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
trdno	A11	2	celotna vezava	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
trdno	A12	3	celotna vezava	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
trdno	B10	4	celotna vezava	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	B11	5	celotna vezava	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
trdno	B12	6	celotna vezava	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
trdno	C10	1	hladen E2 (visok)	NSB	S1	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
trdno	C11	2	hladen E2 (visok)	NSB	S2	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
trdno	C12	3	hladen E2 (visok)	NSB	S3	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
trdno	D10	4	hladen E2 (visok)	NSB	S4	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
trdno	D11	5	hladen E2 (visok)	NSB	S5	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
trdno	D12	6	hladen E2 (visok)	NSB	S6	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
trdno	E10	1	kontrola s pufrom	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
trdno	E11	2	kontrola s pufrom	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
trdno	E12	3	kontrola s pufrom	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
trdno	F10	4	kontrola s pufrom	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
trdno	F11	5	kontrola s pufrom	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
trdno	F12	6	kontrola s pufrom	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
trdno	G10 (*)	1	slepi vzorec (za vroče)	vroč	H1	—	90	—	10	—	100	—

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
trdno	G11 (*)	2	slepi vzorec (za vroče)	vroč	H2	—	90	—	10	—	100	—
trdno	G12 (*)	3	slepi vzorec (za vroče)	vroč	H3	—	90	—	10	—	100	—
trdno	H10 (*)	4	slepi vzorec (za vroče)	vroč	H4	—	90	—	10	—	100	—
trdno	H11 (*)	5	slepi vzorec (za vroče)	vroč	H5	—	90	—	10	—	100	—
trdno	H12	6	slepi vzorec (za vroče)	vroč	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	neznano 1	U1	1	1,00E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A2	2	neznano 1	U1	1	1,00E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A3	3	neznano 1	U1	1	1,00E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	B1	1	neznano 1	U1	2	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B2	2	neznano 1	U1	2	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B3	3	neznano 1	U1	2	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	C1	1	neznano 1	U1	3	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C2	2	neznano 1	U1	3	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C3	3	neznano 1	U1	3	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	D1	1	neznano 1	U1	4	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D2	2	neznano 1	U1	4	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D3	3	neznano 1	U1	4	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	E1	1	neznano 1	U1	5	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E2	2	neznano 1	U1	5	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E3	3	neznano 1	U1	5	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F1	1	neznano 1	U1	6	1,00E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F2	2	neznano 1	U1	6	1,00E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F3	3	neznano 1	U1	6	1,00E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	G1	1	neznano 1	U1	7	1,00E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G2	2	neznano 1	U1	7	1,00E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G3	3	neznano 1	U1	7	1,00E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	H1	1	neznano 1	U1	8	1,00E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H2	2	neznano 1	U1	8	1,00E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	H3	3	neznano 1	U1	8	1,00E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	A4	1	neznano 2	U2	1	1,00E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A5	2	neznano 2	U2	1	1,00E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A6	3	neznano 2	U2	1	1,00E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	B4	1	neznano 2	U2	2	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B5	2	neznano 2	U2	2	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B6	3	neznano 2	U2	2	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	C4	1	neznano 2	U2	3	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C5	2	neznano 2	U2	3	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C6	3	neznano 2	U2	3	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	D4	1	neznano 2	U2	4	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D5	2	neznano 2	U2	4	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D6	3	neznano 2	U2	4	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	E4	1	neznano 2	U2	5	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	E5	2	neznano 2	U2	5	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E6	3	neznano 2	U2	5	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F4	1	neznano 2	U2	6	1,00E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F5	2	neznano 2	U2	6	1,00E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F6	3	neznano 2	U2	6	1,00E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	G4	1	neznano 2	U2	7	1,00E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G5	2	neznano 2	U2	7	1,00E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G6	3	neznano 2	U2	7	1,00E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	H4	1	neznano 2	U2	8	1,00E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H5	2	neznano 2	U2	8	1,00E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H6	3	neznano 2	U2	8	1,00E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	A7	1	neznano 3	U3	1	1,00E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A8	2	neznano 3	U3	1	1,00E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A9	3	neznano 3	U3	1	1,00E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	B7	1	neznano 3	U3	2	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B8	2	neznano 3	U3	2	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B9	3	neznano 3	U3	2	1,00E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	C7	1	neznano 3	U3	3	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C8	2	neznano 3	U3	3	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C9	3	neznano 3	U3	3	1,00E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	D7	1	neznano 3	U3	4	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D8	2	neznano 3	U3	4	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D9	3	neznano 3	U3	4	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	E7	1	neznano 3	U3	5	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E8	2	neznano 3	U3	5	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E9	3	neznano 3	U3	5	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F7	1	neznano 3	U3	6	1,00E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F8	2	neznano 3	U3	6	1,00E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	F9	3	neznano 3	U3	6	1,00E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	G7	1	neznano 3	U3	7	1,00E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G8	2	neznano 3	U3	7	1,00E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G9	3	neznano 3	U3	7	1,00E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	H7	1	neznano 3	U3	8	1,00E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H8	2	neznano 3	U3	8	1,00E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H9	3	neznano 3	U3	8	1,00E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	A10	1	kontrola E2 (max)	trdno	E2max1	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,00E ⁻⁷
P1	A11	2	kontrola E2 (max)	trdno	E2max2	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,00E ⁻⁷
P1	A12	3	kontrola E2 (max)	trdno	E2max3	1,00E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,00E ⁻⁷
P1	B10	1	kontrola E2 (IC50)	trdno	E2IC501	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	kontrola E2 (IC50)	trdno	E2IC502	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	kontrola E2 (IC50)	trdno	E2IC503	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	C10	1	kontrola NE (max)	trdno	nemax1	1,00E ^{-3,5}	30	50	10	10	100	1,00E ^{-4,5}
P1	C11	2	kontrola NE (max)	trdno	nemax2	1,00E ^{-3,5}	30	50	10	10	100	1,00E ^{-4,5}
P1	C12	3	kontrola NE (max)	trdno	nemax3	1,00E ^{-3,5}	30	50	10	10	100	1,00E ^{-4,5}
P1	D10	1	kontrola NE (IC50)	trdno	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	kontrola NE (IC50)	trdno	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	kontrola NE (IC50)	trdno	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	hladen E2 (visok)	NSB	S1	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E11	2	hladen E2 (visok)	NSB	S2	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E12	3	hladen E2 (visok)	NSB	S3	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F10	4	hladen E2 (visok)	NSB	S4	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F11	5	hladen E2 (visok)	NSB	S5	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F12	6	hladen E2 (visok)	NSB	S6	1,00E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶

Plošča	Položaj	Ponovljeni vzorec	Vrsta jamice	Oznaka jamice	Oznaka koncentracije	Začetna koncentracija kompetitorja (M)	Zaloga hrER (μl)	Količina pufra (μl)	Količina sledila (vroč E2) (μL)	Količina s plošče z razredčinami (μL)	Končna količina (μl)	Končna koncentracija kompetitorja (M)
P1	G10	1	celotna vezava	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	celotna vezava	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	celotna vezava	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	celotna vezava	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	celotna vezava	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	celotna vezava	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Opozoriti je treba, da so ‚vroče‘ jamice med inkubacijo prazne. 10 μl se doda samo za scintilacijsko štetje.

Dodatek 4

PREUDARKI ZA ANALIZO PODATKOV IZ PRESKUSA KOMPETITIVNE VEZAVE NA ČLOVEŠKI REKOMBINANTNI ESTROGENSKI RECEPTOR (HRER)

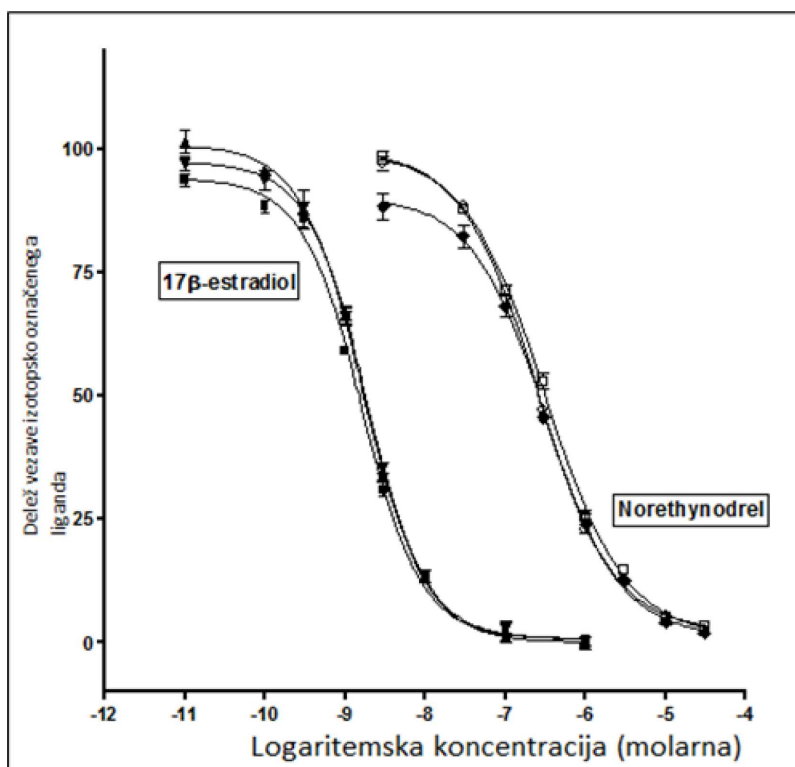
1. S preskusom kompetitivne vezave na hrERa se meri vezava ene same koncentracije [^3H]-17 β -estradiola ob prisotnosti naraščajočih koncentracij preskusne kemikalije. Krivulja kompetitivne vezave se izriše kot specifična vezava [^3H]-17 β -estradiola v odvisnosti od koncentracije (enote log10) kompetitorja. Koncentracija preskusne kemikalije, ki zavre 50 % največje specifične vezave [^3H]-17 β -estradiola, je IC_{50} .

Podatkovna analiza za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko (1)

2. Podatki iz kontrolnih ponovitev se pretvorijo (tj. delež specifične vezave [^3H]-17 β -estradiola in logaritemska koncentracija kontrolne koncentracije) za nadaljnjo analizo. Ocene vrednosti $\log(\text{IC}_{50})$ za pozitivne kontrole (npr. referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko) je treba določiti z uporabo ustrezne programske opreme za nelinearno prileganje krivulje, da ustreza štiriparametrski Hillovi enačbi (npr. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Vrh, dno, naklon in $\log(\text{IC}_{50})$ lahko pri prileganju teh krivulj običajno ostanejo neomejeni. Pri določanju najboljšega prileganja je treba uporabiti robustno regresijo, razen če se poda utemeljitev. Navesti je treba izbrano metodo za robustno regresijo. Popravek zaradi izgube liganda za preskusa hrER FW ali CER1 ni bil potreben, vendar se lahko po potrebi preuči. Po začetni analizi je treba pregledati vsako krivuljo vezave, da se zagotovi ustrezna prilagoditev modelu. Relativna vezavna afiniteta (RBA) za snov, ki se veže šibko, se lahko izračuna kot delež $\log(\text{IC}_{50})$ za snov, ki se veže šibko, v odvisnosti od $\log(\text{IC}_{50})$ za 17 β -estradiol. Rezultate za pozitivne kontrole in kontrole s snovjo, ki se ne veže, je treba oceniti z uporabo meril za učinkovitost preskusa in meril za sprejemljivost, kot so opisana v tej preskusni metodi (odstavek 20), Dodatku 2 (preskus FW, odstavki 41–51) in Dodatku 3 (preskus CER1, odstavki 41–51). Primeri treh ponovitev za referenčni estrogen in snov, ki se veže šibko, so prikazani na sliki 1.

Slika 1

Primeri krivulj kompetitivne vezave za referenčni estrogen in kontrolno snov, ki se veže šibko

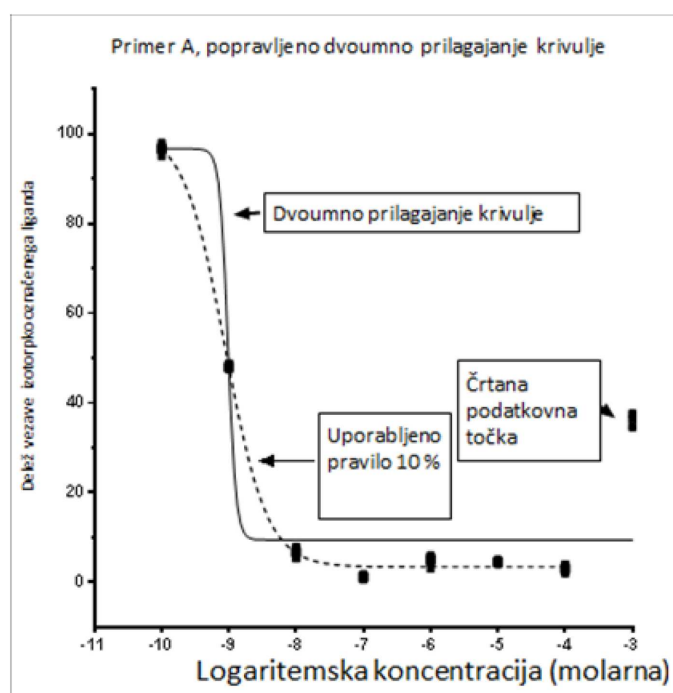


Podatkovna analiza za preskusne kemikalije

3. Podatke za vse preskusne kemikalije je treba analizirati z uporabo stopenjskega pristopa, s čimer se zagotovi, da so podatki ustrezno analizirani in da je vsaka krivulja kompetitivne vezave ustrezno razvrščena. Pri vsaki ponovitvi za preskusno kemikalijo je treba sprva izvesti standardizirano podatkovno analizo, enako tisti, ki se uporablja za kontrole z referenčnim estrogenom in snovjo, ki se veže šibko. Ko je ta analiza končana, sta potrebna tehnični pregled parametrov prilaganja krivulje in vizualni pregled tega, kako dobro se podatki prilagajajo dobljeni krivulji kompetitivne vezave za vsako ponovitev. Med tem tehničnim pregledom so opažanja od koncentracije odvisnega zmanjšanja deleža specifično vezanega [^3H]-17 β -estradiola, nizka variabilnost med tehničnimi ponovljenimi vzorci pri vsaki koncentraciji kemikalije in skladnost parametrov prilaganja med tremi ponovitvami dober znak, da so bili preskus in podatkovne analize izvedeni pravilno. Pri pregledu rezultatov iz vsake ponovitve za preskusno kemikalijo je treba uporabiti strokovno presojo, podatke, ki se uporabijo za razvrstitev vsake preskusne kemikalije med snovi, ki se vežejo, ali snovi, ki se ne vežejo, pa mora biti mogoče znanstveno utemeljiti.
4. Občasno se lahko pojavijo primeri podatkov, ki zahtevajo dodatno pozornost, da se podatki o vezavi na hrER ustrezno analizirajo in razlagajo. Prejšnje študije so pokazale na primere, ko se lahko analiza in razlaga podatkov o kompetitivni vezavi na receptor zapleteta zaradi zvišanja deleža specifične vezave, ko se kemikalije preskušajo pri najvišjih koncentracijah (slika 2). To je dobro znana težava, ki se pojavlja ob uporabi protokolov za številne preskuse kompetitivne vezave na receptor (3). V teh primerih je od koncentracije odvisen odziv opažen pri nižjih koncentracijah, ko pa se koncentracija preskusne kemikalije približa meji topnosti, se izpodrinjenje [^3H]-17 β -estradiola ne zmanjšuje več. V teh primerih podatki za višje koncentracije kažejo, da je bila dosežena biološka meja preskusa. Ta pojav je na primer pogosto povezan z netopnostjo in obarjanjem kemikalij pri visokih koncentracijah, lahko pa tudi odraža preseženo zmožnost oglja, prevlečenega z dekstranom, da prestreže nevezan radioaktivno označen ligand med postopkom ločevanja pri najvišjih koncentracijah kemikalije. Če se take podatkovne točke ne izključijo iz prilagajanja podatkov o kompetitivni vezavi sigmoidni krivulji, lahko včasih pride do napačne razvrstitve potenciala preskusne kemikalije za vezavo na ER (slika 2). Da bi se to preprečilo, protokol za preskuse vezave na hrER FW in CERi vključuje možnost, da se iz analiz izključijo podatkovne točke, pri katerih je srednja vrednost ponovljenih vzorcev za delež specifične vezave [^3H]-17 β -estradiola najmanj 10 % nad opaženim deležem srednje vrednosti pri nižji koncentraciji (tj. tako imenovano pravilo 10 %). To pravilo se lahko za dano krivuljo uporabi le enkrat; da se lahko krivulja ustrezno razvrsti, morajo ostati podatki za vsaj šest koncentracij.

Slika 2

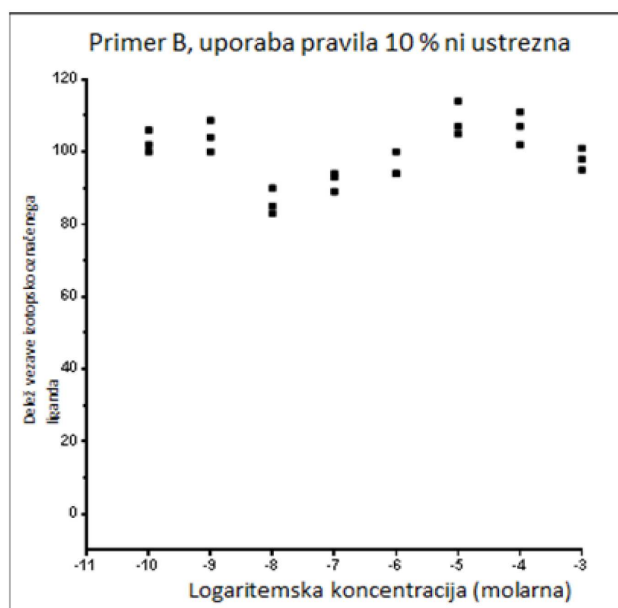
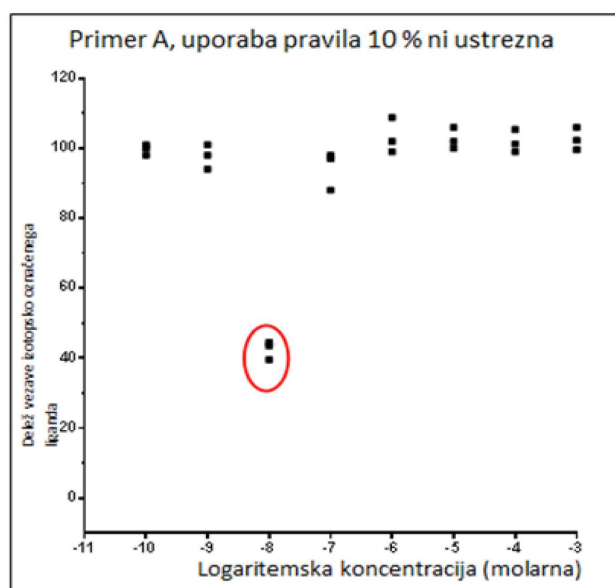
Primeri krivulj kompetitivne vezave z uporabo pravila 10 % in brez nje



5. Ustrezno uporabo pravila 10 % za popravek teh krivulj je treba skrbno pretehtati in pridržati za tiste primere, v katerih se z veliko verjetnostjo nakazuje, da gre za snov, ki se veže na hrER. Med izvajanjem poskusov za validacijsko študijo preskusa vezave na hrER FW je bilo opaženo, da ima pravilo 10 % včasih neželene in nepredvidene posledice. Kemikalije, ki niso reagirale z receptorjem (tj. snovi, ki se dejansko ne vežejo), so pogosto pokazale variabilnost pri 100-odstotni vezavi radioaktivno označenega liganda, ki je bila med različnimi preskušeni koncentracijami več kot 10-odstotna. Če bi bila najnižja vrednost slučajno pri nizki koncentraciji, bi se podatki za vse višje koncentracije potencialno lahko črtali iz analize, tako da bi se uporabilo pravilo 10 %, čeprav bi bile zadevne koncentracije lahko koristne pri ugotavljanju, da je kemikalija snov, ki se ne veže. Na sliki 3 so prikazani primeri, v katerih uporaba pravila 10 % ni ustrezna.

Slika 3

Primeri podatkov o kompetitivni vezavi, pri katerih uporaba pravila 10 % ni ustrezna



Viri

- (1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 226), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (2) Motulsky, H., in Christopoulos, A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornija, str. 187–191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf
- (3) Laws, S. C., Yavanhxay, S., Cooper, R. L., in Eldridge, J. C. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. *Toxicological Sci.* 94(1): 46–56.

B.71 PRESKUSI IN VITRO ZA PREOBČUTLJIVOST KOŽE, S KATERIMI SE OBRAVNAVA KLJUČNI DOGODEK AKTIVACIJE DENDRITSKIH CELIC PRI POTEKU NEŽELENEGA IZIDA (AOP) ZA PREOBČUTLJIVOST KOŽE**SPLOŠNI UVOD****Preskusna metoda za ključni dogodek aktivacije dendritskih celic**

1. Povzročitelj preobčutljivosti kože je snov, ki povzroči alergijski odziv po stiku s kožo, kot je opredeljeno v globalno usklajenem sistemu Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN) (1) ter Uredbi (ES) št. 1272/2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi (uredba CLP) (1). Obstaja splošno soglasje glede ključnih bioloških dogodkov, ki so osnova za preobčutljivost kože. Sedanje znanje o kemijskih in bioloških mehanizmi, povezanih s preobčutljivostjo kože, je bilo v okviru programa AOP OECD (2) povzeto kot potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP) od začetnega dogodka na molekularni ravni prek vmesnih dogodkov do škodljivega učinka, tj. alergijskega kontaktnega dermatitisa. V tem primeru je začetni dogodek na molekularni ravni (tj. prvi ključni dogodek) kovalentna vezava elektrofilnih snovi na nukleofilne centre v beljakovinah kože. Drugi ključni dogodek v tem poteku neželenega izida se odvija v keratinocitih ter vključuje vnetni odziv in spremembe v izražanju genov, povezanem s posebnimi potmi celičnega signaliziranja, kot so poti, odvisne od odzivnega elementa za antioksidante/elektrofile (ARE). Tretji ključni dogodek je aktivacija dendritskih celic (DC), ki se običajno ocenjuje z izražanjem posebnih celičnih površinskih označevalcev, tj. kemokinov in citokinov. Četrti ključni dogodek je aktivacija in proliferacija celic T, kar se posredno ocenjuje pri lokalni analizi bezgavk pri miših (LLNA) (3).
2. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 442E (2017). V njej so opisani preskusi *in vitro*, s katerimi se obravnavajo mehanizmi, opisani v okviru ključnega dogodka aktivacije dendritskih celic pri poteku neželenega izida za preobčutljivost kože (2). Preskusna metoda vključuje preskuse, ki jih je treba uporabiti v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, v skladu z GHS ZN in uredbo CLP.

Preskusi, opisani v tej preskusni metodi, so:

— preskus aktivacije humane celične linije (h-CLAT);

— preskus aktivacije celične linije U937 (U-SENS™);

— preskus poročevalskega gena za interleukin-8 (preskus IL-8 Luc).

3. Preskusi, vključeni v to preskusno metodo, in ustrezne smernice OECD za preskušanje se lahko razlikujejo glede postopka, uporabljenega za pridobitev podatkov in meritev, vendar se lahko enakovredno uporabljajo za obravnavanje zahtev držav za rezultate preskusov v zvezi s ključnim dogodkom aktivacije dendritskih celic pri poteku neželenega izida za preobčutljivost kože, hkrati pa se izkoristi medsebojno priznavanje podatkov OECD.

(1) Uredba (ES) št. 1272/2008 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o razvrščanju, označevanju in pakiranju snovi ter zmesi, o spremembi in razveljavitvi direktiv 67/548/EGS in 1999/45/ES ter spremembi Uredbe (ES) št. 1907/2006 (UL L 353, 31.12.2008, str. 1).

Osnova in načela preskusov, vključenih v preskusno metodo, ki temelji na ključnem dogodku

4. Ocena preobčutljivosti kože se je običajno izvajala z uporabo laboratorijskih živali. Pri klasični metodi, pri kateri se uporabljajo morski prašički, tj. Magnusson-Kligmanovem maksimizacijskem preskusu na morskih prašičkih (preskus GPMT) in Buehlerjevem preskusu (PM B.6 (4)), se ocenjuje preobčutljivost kože v fazah indukcije in elicitacije. Lokalna analiza bezgavk pri miših, LLNA (PM B.42) (3) in njeni dve neradioaktivni prilagoditvi, tj. LLNA: DA (PM B.50 (5)) in LLNA: BrdU-ELISA (PM B.51 (6)), vse ocenjujejo le indukcijski odziv in so bile prav tako sprejete, saj je njihova prednost v primerjavi s preskusi na morskih prašičkih v tem, da upoštevajo dobrobit živali in zagotavljajo objektivne meritve v fazi indukcije preobčutljivosti kože.
5. Nedavno sta bili za prispevek k ocenjevanju nevarnosti kemikalij za preobčutljivost kože sprejeti preskusni metodi *in chemico* in *in vitro*, ki temeljita na mehanističnih merilih ter s katerima se obravnavata prvi ključni dogodek (PM B.59; neposredni preskus reaktivnosti peptidov (7)) in drugi ključni dogodek (PM B.60; luciferazna preskusna metoda z ARE-Nrf2 (8)).
6. S preskusi, opisanimi v tej preskusni metodi, se kvantificirajo bodisi spremembe v izražanju celičnih površinskih označevalcev, povezanih s procesom aktivacije monocitov in dendritskih celic po izpostavljenosti povzročiteljem preobčutljivosti (npr. CD54, CD86), bodisi spremembe v izražanju IL-8, tj. citokina, povezanega z aktivacijo dendritskih celic. Poročalo se je, da povzročitelji preobčutljivosti kože sprožijo izražanje celičnih membranskih označevalcev, kot so CD40, CD54, CD80, CD83 in CD86, ter nastanek proinflammatory citokinov, kot sta IL-1 β in TNF- α , ter več kemokinov, vključno z IL-8 (CXCL8) in CCL3 (9) (10) (11) (12), povezanih z aktivacijo dendritskih celic (2).
7. Ker pa je aktivacija dendritskih celic le en ključni dogodek pri poteku neželenega izida za preobčutljivost kože (2) (13), informacije, pridobljene samo s preskusi, s katerimi se merijo označevalci aktivacije dendritskih celic, morda ne bodo zadostovale za ugotovitev obstoja ali neobstoja potenciala kemikalij za povzročanje preobčutljivosti kože. Zato se predlaga, naj se podatki, pridobljeni s preskusi, opisanimi v tej preskusni metodi, uporabijo v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, kadar se uporabijo v okviru celostnih pristopov k testiranju in ocenjevanju (Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)), skupaj z drugimi ustreznimi dopolnilnimi informacijami, ki izhajajo na primer iz poskusov *in vitro*, s katerimi se obravnavajo drugi ključni dogodki pri poteku neželenega izida preobčutljivosti kože, in nepreskusnih metod, vključno z navzkrižnim branjem pri podobnih kemijskih snoveh (13). Primeri uporabe podatkov, pridobljenih s temi preskusi v okviru opredeljenih pristopov, tj. standardiziranih pristopov v zvezi s sklopom uporabljenih virov informacij in v zvezi s postopkom, uporabljenim za podatke za pridobitev napovedi, so bili objavljeni (13) ter se lahko uporabijo kot koristni elementi v okviru IATA.
8. Preskusov, opisanih v tej preskusni metodi, ni mogoče uporabiti samostojno niti za razvrstitev povzročiteljev preobčutljivosti kože v podkategoriji 1A in 1B, kot sta opredeljeni v GHS ZN/uredbi CLP, za organe, ki uporabljajo ti neobvezni podkategoriji, niti za napoved stopnje povzročanja preobčutljivosti v okviru odločanja o oceni varnosti. Vendar pa je, odvisno od regulativnega okvira, pozitivne rezultate, pridobljene s temi metodami, kot take mogoče uporabiti za razvrstitev kemikalije v kategorijo 1 po GHS ZN/uredbi CLP.
9. Pojem 'preskusna kemikalija' se pri tej preskusni metodi nanaša na to, kar se preskuša ⁽¹⁾, in ni povezan z uporabnostjo preskusov za preskušanje snovi iz ene sestavine, snovi z več sestavinami in/ali zmesi. Za zdaj so na voljo omejene informacije o uporabnosti preskusov za snovi z več sestavinami/zmesi (14) (15). Ne glede na to so preskusi tehnično ustrezni za preskušanje snovi z več sestavinami in zmesi. Preden se ta preskusna metoda uporabi na zmesi, da bi se pridobili podatki za predvideni regulativni namen, pa je treba preučiti, ali in zakaj lahko zagotovi ustrezne rezultate za navedeni namen ⁽²⁾. Kadar obstaja regulativna zahteva za preskušanje zmesi, taki preudarki niso potrebni. Poleg tega je treba pri preskušanju snovi z več sestavinami ali zmesi upoštevati morebitno interferenco citotoksičnih sestavin z opaženimi odzivi.

⁽¹⁾ Junija 2013 je bil na skupnem zasedanju OECD sprejet dogovor, da bi bilo treba v novih in posodobljenih smernicah OECD za preskušanje pojem 'preskusna kemikalija', ki opisuje, kaj se preskuša, uporabljati dosledneje, kjer je to mogoče.

⁽²⁾ Ta stavek je bil predlagan in sprejet aprila 2014 na sestanku delovne skupine nacionalnih koordinatorjev za smernice za preskušanje.

VIRI

- (1) Združeni narodi (ZN) (2015). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). Šesta revidirana izdaja. New York in Ženeva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Na voljo na: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment (št. 168). Na voljo na: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Poglavje B.42 te priloge: Lokalna analiza bezgavk.
- (4) Poglavje B.6 te priloge: Senzibilizacija kože.
- (5) Poglavje B.50 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk: DA.
- (6) Poglavje B.51 te priloge: Preobčutljivost kože: lokalna analiza bezgavk: BrdU-ELISA.
- (7) Poglavje B.59 te priloge: Preobčutljivost kože *in chemico*: neposredni preskus reaktivnosti peptidov (DPRA).
- (8) Poglavje B.60 te priloge: Preobčutljivost kože *in vitro*: luciferazna preskusna metoda z ARE-Nrf2.
- (9) Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271–96.
- (10) Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, L. L., in Banchereau, J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841–7.
- (11) Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., in Tagami, H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031–8.

-
- (12) Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z. U., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y., in Tagami, H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390–8.
- (13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment (št. 256): Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (14) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., Itagaki, H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275–284.
- (15) Piroird, C., Ovigne, J. M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901–916.

Dodatek 1

PREOBUČUTLJIVOST KOŽE IN VITRO: PRESKUS AKTIVACIJE HUMANE CELIČNE LINIJE (H-CLAT)

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

1. S preskusom h-CLAT se kvantificirajo spremembe v izražanju celičnih površinskih označevalcev, povezanih s procesom aktivacije monocitov in dendritskih celic (DC) (tj. CD86 in CD54), v celični liniji humane monocitne levkemije THP-1 po izpostavljenosti povzročiteljem preobčutljivosti (1) (2). Izmerjene ravni izražanja celičnih površinskih označevalcev CD86 in CD54 se nato uporabijo za podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože.
2. Preskus h-CLAT je bil ocenjen v validacijski študiji pod vodstvom Referenčnega laboratorija Evropske unije za alternative testiranju na živalih (EURL ECVAM) in z naknadnim neodvisnim medsebojnim strokovnim pregledom, ki ga je izvedel Znanstveni svetovni odbor (ESAC) EURL ECVAM. Ob upoštevanju vseh razpoložljivih dokazov ter prispevkov regulatorjev in deležnikov je EURL ECVAM (3) uporabo preskusa h-CLAT priporočil v okviru IATA za podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, zaradi razvrstitve glede na nevarnost in označevanje. Primeri uporabe podatkov preskusa h-CLAT v povezavi z drugimi informacijami so navedeni v virih (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).
3. Izkazalo se je, da se lahko preskus h-CLAT prenese v laboratorije, ki imajo izkušnje s tehnikami gojenja celičnih kultur in analizo s pretočno citometrijo. Stopnja ponovljivosti napovedi, ki jo je mogoče pričakovati pri preskusu, je v enem in več laboratorijih 80-odstotna (3) (12). Rezultati, pridobljeni z validacijsko študijo (13) in drugimi objavljenimi študijami (14), na splošno kažejo, da je v primerjavi z rezultati LLNA točnost pri razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti, 85-odstotna ($N = 142$), pri čemer je občutljivost 93-odstotna (94/101), specifičnost pa 66-odstotna (27/41) (na podlagi ponovne analize, ki jo je izvedel EURL ECVAM (12), ob upoštevanju vseh obstoječih podatkov in brez upoštevanja negativnih rezultatov za kemikalije z vrednostjo log Kow, večjo od 3,5, kot je opisano v odstavku 4). Lažno negativne napovedi pri preskusu h-CLAT se bodo bolj verjetno nanašale na kemikalije z nizko do zmerno stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1B po GHS ZN/uredbi CLP) kot na kemikalije z visoko stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1A po GHS ZN/uredbi CLP) (4) (13) (15). Vse te informacije skupaj kažejo, da metoda h-CLAT uporabno prispeva k opredelitvi nevarnosti za povzročanje preobčutljivosti kože. Vendar so tukaj navedene vrednosti točnosti za preskus h-CLAT kot samostojni preskus zgolj okvirne, saj ga je treba obravnavati skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavkov 7 in 8 iz Splošnega uvoda. Poleg tega je treba pri ocenjevanju metod za preobčutljivost kože, ki se ne izvajajo na živalih, upoštevati, da preskus LLNA in druga testiranja na živalih ne odražajo v celoti razmer pri človeku.
4. Na podlagi trenutno razpoložljivih podatkov se je pokazalo, da se metoda h-CLAT lahko uporablja za preskusne kemikalije, ki zajemajo različne organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (kot je določena v študijah *in vivo*) ter fizikalno-kemijske lastnosti (3) (14) (15). Metoda h-CLAT se uporablja za preskusne kemikalije, ki so topne ali tvorijo stabilno disperzijo (tj. koloid ali suspenzija, v kateri se preskusna kemikalija ne usede ali loči od topila/vehikla v različne faze) v ustreznem topilu/vehiklu (glej odstavek 14). Preskusne kemikalije z vrednostjo Log Kow, večjo od 3,5, običajno dajo lažno negativne rezultate (14). Zato se negativni rezultati, pridobljeni s preskusnimi kemikalijami z vrednostjo Log Kow, večjo od 3,5, ne bi smeli upoštevati. Pozitivni rezultati, pridobljeni s preskusnimi kemikalijami z vrednostjo Log Kow, večjo od 3,5, pa bi se še vedno lahko uporabili za podporo opredelitvi preskusne kemikalije kot povzročitelja preobčutljivosti kože. Poleg tega se lahko zaradi omejene presnovne zmogljivosti uporabljene celične linije (16) ter poskusnih pogojev pri prohaptenih (tj. snoveh, ki potrebujejo encimsko aktivacijo, na primer z encimi P450) in prehaptjenih (tj. snoveh, aktiviranih z oksidacijo), zlasti pri tistih s počasno oksidacijo, prav tako pojavijo negativni rezultati v preskusu h-CLAT (15). Fluorescentne preskusne kemikalije se lahko ocenjujejo s preskusom h-CLAT (17), vendar bodo močne fluorescentne preskusne kemikalije, ki svetlobo oddajajo na isti valovni dolžini kot fluorescein izotiocianat (FITC) ali propidijev jodid (PI), vplivale na zaznavanje s pretočno citometrijo, zato jih z uporabo protiteles, konjugiranih s FITC, ali PI ni mogoče pravilno oceniti. V takem primeru se lahko uporabijo druga s fluorokromom označena protitelesa oziroma drugi označevalci citotoksičnosti, če je mogoče dokazati, da dajejo podobne rezultate kot s FITC označena protitelesa (glej odstavek 24) ali PI (glej odstavek 18), npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 1.2. Glede na navedeno je treba negativne rezultate razlagati v okviru navedenih omejitev in skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA. Kadar obstajajo dokazi, da metode h-CLAT ni mogoče uporabiti za druge specifične kategorije preskusnih kemikalij, se ta metoda zanje ne bi smela uporabiti.

5. Kot je navedeno zgoraj, metoda h-CLAT podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože. Kadar se uporablja v celostnih pristopih, kot je IATA, pa lahko prispeva tudi k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti kože (4) (5) (9). Vendar je potrebno nadaljnje delo, ki po možnosti temelji na podatkih za ljudi, da se določi, kako bi lahko rezultati preskusa h-CLAT prispevali k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti.
6. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 1.1.

NAČELO PRESKUSA

7. Metoda h-CLAT je preskus *in vitro*, s katerim se kvantificirajo spremembe v izražanju celičnih površinskih označevalcev (tj. CD86 in CD54) na celični liniji humane monocitne levkemije, tj. celicah THP-1, po 24-urni izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Te površinske molekule so tipični označevalci aktivacije monocitnih celic THP-1 in lahko posnemajo aktivacijo dendritskih celic, ki ima ključno vlogo pri označevanju celic T. Spremembe v izražanju površinskih označevalcev se merijo s pretočno citometrijo po obarvanju celic s protitelesi, označenimi s fluorokromom. Sočasno se izvede tudi meritev citotoksičnosti, da se oceni, ali se pri subcitotoksičnih koncentracijah pojavi povečano izražanje površinskih označevalcev. Izračuna se relativna intenziteta fluorescence površinskih označevalcev v primerjavi s kontrolo s topilom/vehiklom in uporabi v napovednem modelu (glej odstavek 26) za podporo razlikovanja med povzročitelji preobčutljivosti in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti.

DOKAZOVANJE USPOSABLJENOSTI

8. Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da uporabijo 10 snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 1.2. Poleg tega morajo uporabniki preskusov vzdrževati zbirko preteklih podatkov, pridobljenih s preverjanji reaktivnosti (glej odstavek 11) ter pozitivnimi kontrolami in kontrolami s topilom/vehiklom (glej odstavke od 20 do 22), ter te podatke uporabiti za potrditev, da se v njihovem laboratoriju vzdržuje obnovljivost preskusa skozi čas.

POSTOPEK

9. Ta preskus temelji na protokolu št. 158 storitve za podatkovne zbirke o alternativnih metodah namesto poskusov na živalih (DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM)) za preskus h-CLAT (18), tj. protokolu, ki se uporablja v validacijski študiji, ki jo usklajuje EURL ECVAM. Priporočljivo je, da se ta protokol uporablja pri izvajanju in uporabi metode h-CLAT v laboratoriju. V nadaljevanju so opisani glavni elementi in postopki za metodo h-CLAT, ki vključuje dva koraka: *poskus za ugotavljanje odmerka* in *meritev izražanja CD86/CD54*.

Priprava celic

10. Za izvedbo metode h-CLAT je treba uporabiti celično linijo humane monocitne levkemije, THP-1. Priporočljivo je, da se celice (TIB-202™) pridobijo iz celične banke z dobrimi kvalifikacijami, kot je American Type Culture Collection.
11. Celice THP-1 se gojijo pri 37°C v navlaženi atmosferi s 5 % CO₂ v gojišču RPMI-1640, dopolnjenem z 10 % fetusnega seruma goveda (FBS), 0,05 mM 2-merkaptotetanolu, 100 enotami/ml penicilina in 100 µg/ml streptomicina. Uporabi penicilina in streptomicina v gojišču se je mogoče izogniti. Vendar morajo v takem primeru uporabniki preveriti, da odsotnost antibiotikov v gojišču ne vpliva na rezultate, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 1.2. Vsekakor je treba za zmanjšanje tveganja kontaminacije upoštevati dobre prakse na področju gojenja celičnih kultur ne glede na prisotnost ali odsotnost antibiotikov v gojišču za celične kulture. Celice THP-1 se rutinsko nasadijo na 2 do 3 dni z gostoto od 0,1 do 0,2 × 10⁶ celic/ml. Vzdrževati jih je treba pri gostoti od 0,1 do 1,0 × 10⁶ celic/ml. Preden se celice uporabijo za preskus, jih je treba kvalificirati s preverjanjem reaktivnosti. Reaktivnost celic je treba preveriti z uporabo pozitivnih kontrol, tj. 2,4-dinitroklorobenzena (DNCB) (št. CAS 97-00-7, z ≥ 99-odstotno čistostjo) in nikljevega sulfata (NiSO₄) (št. CAS 10101-97-0, z ≥ 99-odstotno čistostjo), in negativne kontrole, tj. mlečne kisline (LA) (št. CAS 50-21-5, z ≥ 85-odstotno čistostjo), dva tedna po odtajanju. DNCB in NiSO₄ morata povzročiti pozitiven odziv obeh celičnih površinskih označevalcev CD86 in CD54, LA pa mora povzročiti negativen odziv obeh celičnih površinskih označevalcev CD86 in CD54. Za poskus se uporabijo samo celice, ki so uspešno prestale preverjanje reaktivnosti. Celice se lahko namnožujejo do dva meseca po odtajanju. Število pasaž ne bi smelo presežati 30. Preverjanje reaktivnosti je treba izvesti v skladu s postopki, opisanimi v odstavkih od 20 do 24.

12. Za preskušanje se celice THP-1 nasadijo z gostoto bodisi $0,1 \times 10^6$ celic/ml bodisi $0,2 \times 10^6$ celic/ml in predhodno 72 ur oziroma 48 ur gojijo v stekleničkah za gojenje celičnih kultur. Pomembno je, da je gostota celic v steklenički za gojenje celičnih kultur takoj po obdobju predhodnega gojenja v vsakem poskusu čim bolj konsistentna (z uporabo enega od dveh zgoraj opisanih pogojev predhodnega gojenja), ker bi lahko gostota celic v steklenički za gojenje celičnih kultur takoj po predhodnem gojenju vplivala na izražanje CD86/CD54, ki ga povzročijo alergeni (19). Na dan preskusa se celice, odvzete iz stekleničke za gojenje celičnih kultur, ponovno suspendirajo v svežem gojišču z gostoto 2×10^6 celic/ml. Nato se celice nanesejo na 24-jamično ploščo z ravnim dnom (500 μ l, 1×10^6 celic/jamico) ali 96-jamično ploščo z ravnim dnom (80 μ l, $1,6 \times 10^5$ celic/jamico).

Poskus za ugotavljanje odmerka

13. Poskus za ugotavljanje odmerka se izvede za določitev CV75, ki je koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri je viabilnost celic (CV) 75-odstotna v primerjavi s kontrolo s topilom/vehiklom. Vrednost CV75 se uporabi za določitev koncentracije preskusnih kemikalij za meritev izražanja CD86/CD54 (glej odstavke od 20 do 24).

Priprava preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi

14. Preskusne kemikalije in kontrolne snovi se pripravijo na dan preskusa. Za metodo h-CLAT se preskusne kemikalije raztopijo ali stabilno dispergirajo (glej tudi odstavek 4) v fiziološki raztopini ali gojišču kot prvih možnostih topila/vehikla ali dimetil sulfoksidu (DMSO, z ≥ 99 -odstotno čistostjo) kot drugi možnosti topila/vehikla, če preskusna kemikalija ni topna ali ne tvori stabilne disperzije v prejšnjih dveh topilih/vehiklih, do končnih koncentracij 100 mg/ml (v fiziološki raztopini ali gojišču) ali 500 mg/ml (v DMSO). Poleg zgoraj opisanih topil/vehiklov se lahko uporabijo tudi drugi, če je zagotovljena zadostna znanstvena utemeljitev. Upoštevati je treba stabilnost preskusne kemikalije v končnem topilu/vehiklu.
15. Začenši s 100 mg/l (v fiziološki raztopini ali gojišču) ali 500 mg/ml (v DMSO) osnovnimi raztopinami preskusnih kemikalij je treba izvesti naslednje korake za redčenje:

- za fiziološko raztopino ali gojišče kot topilo/vehikel: pripravi se osem osnovnih raztopin (osem koncentracij) z zaporednimi dvakratnimi redčenji z uporabo ustreznega topila/vehikla. Te osnovne raztopine se nato nadalje 50-kratno razredčijo v gojišče (delovne raztopine). Če najvišja končna koncentracija na plošči, ki znaša 1 000 μ g/ml, ni toksična, je treba največjo koncentracijo znova določiti, tako da se izvede nov preskus citotoksičnosti. Končna koncentracija na plošči ne bi smela presegati 5 000 μ g/ml za preskusne kemikalije, raztopljene ali stabilno dispergirane v fiziološki raztopini ali gojišču;
- za DMSO kot topilo/vehikel: pripravi se osem osnovnih raztopin (osem koncentracij) z zaporednimi dvakratnimi redčenji z uporabo ustreznega topila/vehikla. Te osnovne raztopine se nato nadalje 250-kratno razredčijo v gojišče (delovne raztopine). Končna koncentracija na plošči ne bi smela presegati 1 000 μ g/ml, tudi če ta koncentracija ni toksična.

Delovne raztopine se nazadnje uporabijo za izpostavljenost, tako da se količini suspenzije celic THP-1 na plošči doda enaka količina delovne raztopine (glej tudi odstavek 17), da se doseže nadaljnja dvakratna razredčina (običajno je končni razpon koncentracij na plošči od 7,81 do 1 000 μ g/ml).

16. Kontrola s topilom/vehiklom, uporabljena pri metodi h-CLAT, je gojišče (za preskusne kemikalije, raztopljene ali stabilno dispergirane (glej odstavek 4) v gojišču ali fiziološki raztopini) ali DMSO (za preskusne kemikalije, raztopljene ali stabilno dispergirane v DMSO), ki se preskusi pri enotni končni koncentraciji na plošči v višini 0,2 %. Za kontrolo se uporabi enako redčenje, kot je opisano za delovne raztopine v odstavku 15.

Nanos preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi

17. Gojišče ali delovne raztopine, opisani v odstavkih 15 in 16, se zmešajo v razmerju 1: 1 (v/v) s suspenzijami celic, pripravljenimi na 24- ali 96-jamični plošči z ravnim dnom (glej odstavek 12). Obdelane plošče se nato inkubirajo $24 \pm 0,5$ ure pri 37°C v prisotnosti 5 % CO₂. Paziti je treba, da hlapne preskusne kemikalije ne izhlapijo in da ne pride do navzkrižne kontaminacije med jamicami s preskusnimi kemikalijami, npr. z zatesnitvijo plošče pred inkubacijo s preskusnimi kemikalijami (20).

Barvanje s propidijevim jodidom (PI)

18. Po $24 \pm 0,5$ -urni izpostavljenosti se celice prenesejo v epruvete za vzorce in zberejo s centrifugiranjem. Supernatanti se zavržejo, preostale celice pa znova suspendirajo z 200 μl (v primeru 96 jamic) ali 600 μl (v primeru 24 jamic) fosfatnega pufru s soljo, ki vsebuje 0,1 % govejega serumskega albumina (pufer za barvanje). 200 μl suspenzije celic se prenese na 96-jamično ploščo z ukrivljenim dnom (v primeru 96 jamic) ali v mikroepruveto (v primeru 24 jamic) ter dvakrat spere z 200 μl (v primeru 96 jamic) ali 600 μl (v primeru 24 jamic) pufru za barvanje. Nazadnje se celice znova suspendirajo v pufru za barvanje (npr. 400 μl), nato se doda raztopina PI (npr. 20 μl) (na primer končna koncentracija PI je 0,625 $\mu\text{g/ml}$). Uporabijo se lahko tudi drugi označevalci citotoksičnosti, kot so 7-aminoactinomycin D (7-AAD), tripan modro ali drugi, če je mogoče dokazati, da alternativna barvila zagotavljajo podobne rezultate kot PI, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 1.2.

Merjenje citotoksičnosti s pretočno citometrijo in ocena vrednosti CV75

19. Vnos PI se analizira s pretočno citometrijo z merilnim kanalom FL-3. Pridobi se skupaj 10 000 živih celic (negativni PI). Viabilnost celic se lahko izračuna z naslednjo enačbo v citometrijskem analiznem programu. Kadar je viabilnost celic majhna, je treba pridobiti do 30 000 celic, vključno z mrtvimi celicami. Alternativno se lahko podatki zajemajo eno minuto po začetku analize.

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{Number of living cells}}{\text{Total Number of aquired cells}} \times 100$$

Vrednost CV75 (glej odstavek 13), tj. koncentracija, pri kateri se pokaže 75-odstotno preživetje celic THP-1 (25-odstotna citotoksičnost), se izračuna z log-linearno interpolacijo z naslednjo enačbo:

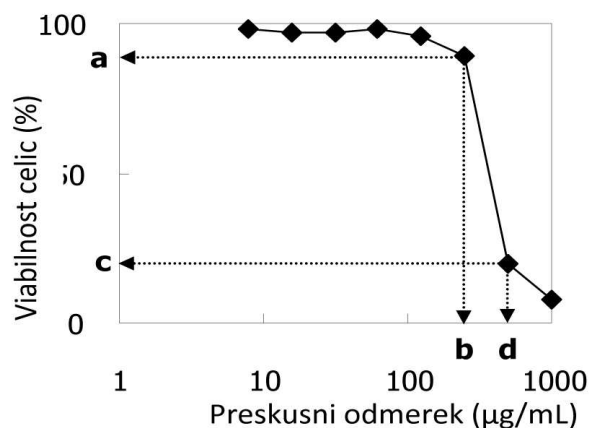
$$\text{Log CV75} = \frac{(75 - c) \times \text{Log}(b) - (75 - a) \times \text{Log}(d)}{a - c}$$

pri čemer je:

a najnižja vrednost viabilnosti celic nad 75 %,

c najvišja vrednost viabilnosti celic pod 75 %,

b in d sta koncentraciji, pri katerih se pokaže vrednost viabilnosti celic a oziroma c.



Za pridobitev CV75 se lahko uporabijo tudi drugi pristopi, če se dokaže, da to ne vpliva na rezultate (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti).

Meritev izražanja CD86/CD54

Priprava preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi

20. Uporabi se ustrezno topilo/vehikel (fiziološka raztopina, gojišče ali DMSO; glej odstavke 14), da se preskusne kemikalije raztopijo ali stabilno dispergirajo. Preskusne kemikalije se najprej razredčijo do koncentracije, ki ustreza 100-kratniku (za fiziološko raztopino ali gojišče) ali 500-kratniku (za DMSO) $1,2 \times CV75$, določeni v poskusu za ugotavljanje odmerka (glej odstavke 19). Če CV75 ni mogoče določiti (tj. če v poskusu za ugotavljanje odmerka ni ugotovljena zadostna citotoksičnost), je treba kot začetno koncentracijo uporabiti najvišjo raztopljeno ali stabilno dispergirano koncentracijo preskusne kemikalije, pripravljeno z vsakim topilom/vehiklom. Opozoriti je treba, da končna koncentracija na plošči ne bi smela presegati $5\,000\ \mu\text{g/ml}$ (v primeru fiziološke raztopine ali gojišča) ali $1\,000\ \mu\text{g/ml}$ (v primeru DMSO). Nato se izvedejo zaporedna 1,2-kratna redčenja z uporabo ustreznega topila/vehikla, da se pridobijo osnovne raztopine (osem koncentracij od $100 \times 1,2 \times CV75$ do $100 \times 0,335 \times CV75$ (za fiziološko raztopino ali gojišče) ali od $500 \times 1,2 \times CV75$ do $500 \times 0,335 \times CV75$ (za DMSO)), ki se preskusijo v metodi h-CLAT (za primer načrta odmerjanja glej protokol DB-ALM št. 158). Osnovne raztopine se nato nadalje 50-kratno (za fiziološko raztopino ali gojišče) ali 250-kratno (za DMSO) razredčijo v gojišče (delovne raztopine). Te delovne raztopine se nazadnje uporabijo za izpostavljenost z nadaljnjim končnim dvakratnim faktorjem redčenja na plošči. Če rezultati ne izpolnjujejo meril za sprejemljivost, opisanih v odstavkih 29 in 30 v zvezi z viabilnostjo celic, se lahko poskus za ugotavljanje odmerka ponovi, da se določi natančnejša vrednost CV75. Upoštevati je treba, da se lahko za meritev izražanja CD86/CD54 uporabijo samo 24-jamične plošče.
21. Kontrola s topilom/vehiklom se pripravi, kot je opisano v odstavku 16. Pozitivna kontrola, uporabljena pri metodi h-CLAT, je DNCB (glej odstavke 11), za katerega se osnovne raztopine pripravijo v DMSO in razredčijo, kot je opisano za osnovne raztopine v odstavku 20. DNCB je treba kot pozitivno kontrolo za meritev izražanja CD86/CD54 uporabiti pri enotni končni koncentraciji na plošči (običajno $4,0\ \mu\text{g/ml}$). Za pridobitev koncentracije DNCB na plošči, ki znaša $4,0\ \mu\text{g/ml}$, se pripravi $2\ \text{mg/ml}$ osnovna raztopina DNCB v DMSO in nadalje 250-krat razredči z gojiščem v $8\ \mu\text{g/ml}$ delovno raztopino. Alternativno se lahko kot koncentracija pozitivne kontrole uporabi tudi CV75 DNCB, ki se določi v vsakem preskuševalnem laboratoriju. Uporabijo se lahko tudi druge primerne pozitivne kontrole, če so na voljo podatki iz preteklih preskusov za izpeljavo primerljivih meril za sprejemljivost ponovitev. Pri pozitivnih kontrolah enotna končna koncentracija na plošči ne bi smela presegati $5\,000\ \mu\text{g/ml}$ (v primeru fiziološke raztopine ali gojišča) ali $1\,000\ \mu\text{g/ml}$ (v primeru DMSO). Merila za sprejemljivost ponovitev so enaka kot merila, opisana za preskusno kemikalijo (glej odstavke 29), razen zadnjega merila za sprejemljivost, saj se pozitivna kontrola preskusi pri eni sami koncentraciji.

Nanos preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi

22. Za vsako preskusno kemikalijo in kontrolno snov je potreben en poskus za pridobitev napovedi. Vsak poskus je sestavljen iz vsaj dveh neodvisnih ponovitev za meritev izražanja CD86/CD54 (glej odstavke od 26 do 28). Vsaka neodvisna ponovitev se izvede na drug dan ali isti dan, če se za vsako ponovitev: (a) pripravijo neodvisne sveže osnovne raztopine in delovne raztopine preskusne kemikalije ter raztopine protiteles in (b) uporabijo neodvisno odvzete celice (npr. celice se odzamejo iz različnih stekleničk za gojenje celičnih kultur); celice lahko sicer izhajajo iz iste pasaje. Preskusne kemikalije in kontrolne snovi, pripravljene kot delovne raztopine ($500\ \mu\text{l}$), se zmešajo s $500\ \mu\text{l}$ suspendiranih celic (1×10^6 celic) v razmerju 1: 1, nato se celice inkubirajo $24 \pm 0,5$ ure, kot je opisano v odstavkih 20 in 21. Pri vsaki ponovitvi zadostuje en sam ponovljen vzorec za vsako koncentracijo preskusne kemikalije in kontrolne snovi, saj se napoved pridobi iz vsaj dveh neodvisnih ponovitev.

Barvanje celic in analiza

23. Po $24 \pm 0,5$ -urni izpostavljenosti se celice s 24-jamične plošče prenesejo v epruvete za vzorce, zberejo s centrifugiranjem in nato dvakrat sperejo z $1\ \text{ml}$ pufra za barvanje (po potrebi se lahko opravijo dodatna spiranja). Po spiranju se celice blokirajo s $600\ \mu\text{l}$ raztopine za blokiranje (pufer za barvanje, ki vsebuje $0,01\ \%$ (w/v) globulina (Cohnova frakcija II, III, humana; SIGMA, #G2388-10G ali enakovreden)) in 15 minut inkubirajo pri 4°C . Po blokiranju se celice razdelijo v tri alikvote po $180\ \mu\text{l}$ na 96-jamično ploščo z ukrivljenim dnom ali v mikroepruveto.
24. Po centrifugiranju se celice 30 minut barvajo s $50\ \mu\text{l}$ s FITC označenih protiteles anti-CD86, anti-CD54 ali mišjih protiteles (izotipa) IgG1 pri 4°C . Protitelesa, opisana v protokolu h-CLAT DB-ALM št. 158 (18), je treba uporabiti tako, da se razredčijo v razmerju 3: 25 v/v (za CD86 (BD-PharMingen, #555657; klon: Fun-1)) ali v razmerju 3: 50 v/v (za CD54 (DAKO, #F7143; klon: 6.5B5)) in IgG1 (DAKO, #X0927)) s pufrom za barvanje. Te faktorje redčenja protiteles so razvijalci preskusov opredelili kot faktorje, ki zagotavljajo najboljše razmerje med signalom in

šumom. Na podlagi izkušenj razvijalcev preskusov je intenziteta fluorescence protiteles med različnimi serijami običajno konsistentna. Vendar lahko uporabniki razmislijo o titraciji protiteles v pogojih lastnega laboratorija, da se opredelijo najboljše koncentracije za uporabo. Uporabijo se lahko tudi druga s fluorokromom označena protitelesa anti-CD86 in/ali anti-CD54, če je mogoče dokazati, da dajejo podobne rezultate kot s FITC konjugirana protitelesa, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 1.2. Opozoriti je treba, da lahko sprememba klona ali dobavitelja protiteles, kot so opisana v protokolu h-CLAT DB-ALM št. 158 (18), vpliva na rezultate. Po vsaj dvakratnem spiranju s 150 µl pufru za barvanje se celice znova suspendirajo v pufru za barvanje (npr. 400 µl), nato se doda raztopina PI (npr. 20 µl za pridobitev končne koncentracije 0,625 µg/ml) ali druga raztopina označevalca citotoksičnosti (glej odstavke 18). Ravni izražanja CD86 in CD54 ter viabilnost celic se analizirajo s pretočno citometrijo.

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

25. Izražanje CD86 in CD54 se analizira s pretočno citometrijo z merilnim kanalom FL-1. Na podlagi geometrijske srednje vrednosti intenzitete fluorescence (MFI) se relativna intenziteta fluorescence (RFI) CD86 in CD54 za celice pozitivne kontrole in celice, tretirane s kemikalijo, izračuna v skladu z naslednjo enačbo:

$$RFI = \frac{MFI \text{ of chemical-treated cell} - MFI \text{ of chemical-treated isotype control cells}}{MFI \text{ of solvent/vehicle-treated ctrl cells} - MFI \text{ of solvent/vehicle-treated isotype ctrl cells}} \times 100$$

Tudi viabilnost celic iz izotipske kontrole (ki so obarvane z mišjimi protitelesi (izotipa) IgG1) se izračuna v skladu z enačbo, opisano v odstavku 19.

Napovedni model

26. Za meritev izražanja CD86/CD54 se vsaka preskusna kemikalija preskusi v najmanj dveh neodvisnih ponovitvah, iz katerih se izpelje ena sama napoved (POZITIVNA ali NEGATIVNA). Napoved h-CLAT se obravnava kot POZITIVNA, če je izpolnjen vsaj eden od naslednjih pogojev v dveh od dveh ali v vsaj dveh od treh neodvisnih ponovitev, v nasprotnem primeru se napoved h-CLAT obravnava kot NEGATIVNA (slika 1):

— RFI CD86 je enaka ali večja od 150 % pri kateri koli preskušeni koncentraciji (z viabilnostjo celic ≥ 50 %);

— RFI CD54 je enaka ali večja od 200 % pri kateri koli preskušeni koncentraciji (z viabilnostjo celic ≥ 50 %).

27. Če sta obe prvi ponovitvi za CD86 in/ali CD54 pozitivni, se glede na navedeno napoved h-CLAT obravnava kot POZITIVNA in tretje ponovitve ni treba izvesti. Prav tako velja, da se napoved h-CLAT obravnava kot NEGATIVNA (ob ustreznem upoštevanju določb odstavka 30), ne da bi bilo treba izvesti tretjo ponovitev, če sta prvi ponovitvi negativni za oba označevalca. Če pa prvi ponovitvi nista skladni pri vsaj enem označevalcu (CD54 ali CD86), je potrebna tretja ponovitev, pri čemer končna napoved temelji na večinskem rezultatu treh posameznih ponovitev (tj. dveh od treh). V zvezi s tem je treba navesti, da je tretja ponovitev potrebna, če se izvedeta dve neodvisni ponovitvi in je ena pozitivna samo za CD86 (v nadaljnjem besedilu: P₁), druga pa samo za CD54 (v nadaljnjem besedilu: P₂). Če je ta tretja ponovitev negativna za oba označevalca (v nadaljnjem besedilu: N), se napoved h-CLAT obravnava kot NEGATIVNA. Če pa je ta tretja ponovitev pozitivna za kateri koli označevalec (P₁ ali P₂) ali za oba označevalca (v nadaljnjem besedilu: P₁₂), se napoved h-CLAT obravnava kot POZITIVNA.

Za natančnejšo izpeljavo vrednosti EC150 in EC200 bodo morda potrebne tri neodvisne ponovitve za *meritev izražanja CD86/CD54*. Končni vrednosti EC150 in EC200 se nato določita kot mediana vrednosti EC, izračunanih iz treh neodvisnih ponovitev. Kadar samo dve od treh neodvisnih ponovitev izpolnjujeta merila za pozitivnost (glej odstavka 26 in 27), se sprejme višja vrednost EC150 ali EC200 od dveh izračunanih vrednosti.

Merila za sprejemljivost

29. Pri uporabi metode h-CLAT morajo biti izpolnjena naslednja merila za sprejemljivost (22) (27).

- Viabilnost celic v gojišču in kontrolah s topilom/vehiklom mora biti več kot 90-odstotna.
- Pri kontroli s topilom/vehiklom vrednosti RFI za CD86 in CD54 ne bi smele presegati pozitivnih meril (RFI CD86 ≥ 150 % in RFI CD54 ≥ 200 %). Vrednosti RFI kontrole s topilom/vehiklom se izračunajo s formulo, opisano v odstavku 25 („MFI kemikalije“ se nadomesti z „MFI topila/vehikla“, „MFI topila/vehikla“ pa se nadomesti z „MFI kontrole (z gojiščem)“).
- Tako pri kontroli z gojiščem kot pri kontroli s topilom/vehiklom mora biti razmerje MFI CD86 in CD54 v primerjavi z izotipsko kontrolo > 105 %.
- Pri pozitivni kontroli (DNCB) morajo vrednosti RFI tako CD86 kot tudi CD54 izpolnjevati pozitivna merila (RFI CD86 ≥ 150 in RFI CD54 ≥ 200), viabilnost celic pa mora biti več kot 50-odstotna.
- Pri preskusni kemikaliji mora biti viabilnost celic več kot 50-odstotna pri vsaj štirih preskušanih koncentracijah v vsaki ponovitvi.

30. Negativni rezultati so sprejemljivi samo za preskusne kemikalije, pri katerih je viabilnost celic manj kot 90-odstotna pri najvišji preskušeni koncentraciji (tj. $1,2 \times CV75$ v skladu z načrtom zaporednega redčenja, opisanim v odstavku 20). Če je viabilnost celic pri $1,2 \times CV75$ enaka ali večja od 90 %, je treba negativni rezultat zavreči. V takem primeru je priporočljivo, da se poskuša izbira odmerka izpopolniti s ponovitvijo določitve CV75. Opozoriti je treba, da je negativni rezultat sprejemljiv, tudi če je viabilnost celic več kot 90-odstotna, kadar se kot največja preskusna koncentracija preskusne kemikalije uporabi 5 000 µg/ml v fiziološki raztopini (ali gojišču ali drugih topilih/vehiklih), 1 000 µg/ml v DMSO ali najvišja topna koncentracija.

Poročilo o preskusu

31. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija

Snov iz ene sestavine:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- fizični videz, vrednost Log Kow, topnost v vodi, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;
- fizični videz, topnost v vodi, topnost v DMSO in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
- molekulska masa ali navidezna molekulska masa v primeru zmesi/polimerov z znano sestavo ali drugi podatki, pomembni za izvedbo študije;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- fizični videz, vrednost Log K_{ow} , topnost v vodi, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo in če je ustrezno;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- sklicevanje na rezultate pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev, če je to ustrezno.

Negativna kontrola in kontrola s topilom/vehiklom:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- fizični videz, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če se uporabijo druga kontrolna topila/vehikli razen tistih, ki so navedeni v smernici za preskušanje, in če so na voljo;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

Preskusni pogoji:

- ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;
- opis uporabljenega preskusa;
- uporabljena celična linija, pogoji njenega hranjenja in vir (npr. laboratorij, ki jo je zagotovil);
- uporabljena pretočna citometrija (npr. model), vključno z nastavitvami instrumenta, globulinom, protitelesi in uporabljenim označevalcem citotoksičnosti;
- postopek, uporabljen za dokazovanje usposobljenosti laboratorija v zvezi z izvedbo preskusa s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti, in postopek, uporabljen za prikaz ponovljivosti izvedbe preskusa v daljšem časovnem obdobju, npr. podatki o kontrolah iz preteklih preskusov in/ali podatki iz preteklih preverjanj reaktivnosti.

Merila za sprejemljivost preskusa:

- viabilnost celic, vrednosti MFI in RFI, pridobljene s kontrolo s topilom/vehiklom, v primerjavi z območji sprejemljivosti;
- viabilnost celic in vrednosti RFI, pridobljene s pozitivno kontrolo, v primerjavi z območji sprejemljivosti;
- viabilnost celic vseh preskušanih koncentracij preskušene kemikalije.

Preskusni postopek:

- uporabljeno število ponovitev;
- uporabljene koncentracije preskusnih kemikalij, nanašanje in čas izpostavljenosti (če je drugačen od priporočenega);
- opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitev;
- opis vseh prilagoditev preskusnega postopka.

Rezultati:

- preglednice s podatki, ki vključujejo vrednost CV75 (če je ustrezno), posamezne geometrijske vrednosti MFI, RFI, vrednosti viabilnosti celic in vrednosti EC150/EC200 (če je ustrezno), pridobljene za preskusno kemikalijo in pozitivno kontrolo v vsaki ponovitvi, ter indikacija ocene preskusne kemikalije glede na napovedni model;
- opis kakršnih koli drugih pomembnih opažanj, če je ustrezno.

Razprava o rezultatih:

- razprava o rezultatih, pridobljenih z metodo h-CLAT;
- obravnavanje rezultatov v okviru IATA, če so na voljo druge pomembne informacije.

Sklepne ugotovitve

VIRI

- (1) Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., Toyoda, H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767–773.
- (2) Miyazawa, M., Ito, Y., Yoshida, Y., Sakaguchi, H., Suzuki, H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428–437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Na voljo na: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi, O., Fukui, S., Okamoto, K., Kurotani, S., Imai, N., Fujishiro, M., Kyotani, D., Kato, Y., Kasahara, T., Fujita, M., Toyoda, A., Sekiya, D., Watanabe, S., Seto, H., Hirota, M., Ashikaga, T., Miyazawa, M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318–1332.
- (5) Hirota, M., Fukui, S., Okamoto, K., Kurotani, S., Imai, N., Fujishiro, M., Kyotani, D., Kato, Y., Kasahara, T., Fujita, M., Toyoda, A., Sekiya, D., Watanabe, S., Seto, H., Takenouchi, O., Ashikaga, T., Miyazawa, M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333–1347.
- (6) Bauch, C., Kolle, S. N., Ramirez, T., Fabian, E., Mehling, A., Teubner, W., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2012). Putting the parts together: Combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489–504.
- (7) Van der Veen, J. W., Rorije, E., Emter, R., Natch, A., van Loveren, H., Ezendam, J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371–379.
- (8) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337–351.
- (9) Jaworska, J. S., Natsch, A., Ryan, C., Strickland, J., Ashikaga, T., Miyazawa, M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: A decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355–2383.

- (10) Strickland, J., Zang, Q., Kleinstreuer, N., Paris, M., Lehmann, D. M., Choksi, N., Matheson, J., Jacobs, A., Lowit, A., Allen, D., Casey, W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol*. DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada, Y., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Hirota, M., Sakaguchi, H., Sasa, H., Nishiyama, N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150–60.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Na voljo na: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- (13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Na voljo na: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi, O., Miyazawa, M., Saito, K., Ashikaga, T., Sakaguchi, H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599–609.
- (15) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., Itagaki, H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: The human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275–284.
- (16) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683–1969.
- (17) Okamoto, K., Kato, Y., Kosaka, N., Mizuno, M., Inaba, H., Sono, S., Ashikaga, T., Nakamura, T., Okamoto, Y., Sakaguchi, H., Kishi, M., Kuwahara, H., Ohno, Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. *AATEX* 15, 81–88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23 str. Na voljo na: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno, M., Yoshida, M., Kodama, T., Kosaka, N., Okamoto, K., Sono, S., Yamada, T., Hasegawa, S., Ashikaga, T., Kuwahara, H., Sakaguchi, H., Sato, J., Ota, N., Okamoto, Y., Ohno, Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. *AATEX* 13, 70–82.

- (20) Sono, S., Mizuno, M., Kosaka, N., Okamoto, K., Kato, Y., Inaba, H., Nakamura, T., Kishi, M., Kuwahara, H., Sakaguchi, H., Okamoto, Y., Ashikaga, T., Ohno, Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89–96.
- (21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz, Francija, 2005, 96 str.
- (22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment (št. 168). Na voljo na: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) Združeni narodi (ZN) (2013). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). Peta revidirana izdaja. New York in Ženeva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- (25) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Okamoto, K., Mizuno, M., Sato, J., Yamada, T., Yoshida, M., Ota, N., Hasegawa, S., Kodama, T., Okamoto, Y., Kuwahara, H., Kosaka, N., Sono, S., Ohno, Y. (2008). Assessment of the Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27–35.

Dodatek 1.1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: Stopnja ujemanja rezultatov preskusa s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusa in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz skladnost se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusa (21).

Potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP): zaporedje dogodkov od kemijske strukture ciljne kemikalije ali skupine podobnih kemikalij prek začetnega dogodka na molekulski ravni do preiskovanega rezultata *in vivo* (22).

Kemikalija: snov ali zmes.

CV75: ocenjena koncentracija, pri kateri je viabilnost celic 75-odstotna.

EC150: koncentracije, pri katerih so vrednosti RFI pri izražanju CD86 150.

EC200: koncentracije, pri katerih so vrednosti RFI pri izražanju CD54 200.

Pretočna citometrija: citometrična tehnika, pri kateri celice, suspendirane v tekočini, vsaka posebej potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe, ki se razprši v vzorcih, značilnih za celice in njihove komponente; celice se pogosto označijo s fluorescentnimi označevalci, tako da se svetloba najprej absorbira in nato oddaja pri spremenjenih frekvencah.

Nevarnost: neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki lahko ob izpostavljenosti temu sredstvu povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment = celostni pristop k testiranju in ocenjevanju): strukturiran pristop, ki se uporablja za ugotavljanje nevarnosti (potencial), opredeljevanje nevarnosti (moč) in/ali oceno varnosti (potencial/moč in izpostavljenost) kemikalije ali skupine kemikalij ter strateško zajame in oceni vse pomembne podatke, da se lahko sprejme regulativna odločitev v zvezi z morebitno nevarnostjo in/ali tveganjem in/ali potrebo po nadaljnjem, ciljno usmerjenem in s tem minimalnem preskušanju.

Kontrola z gojiščem: netretiran ponovljen vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema. Ta vzorec se obdela z vzorci, tretiranimi s preskusno kemikalijo, in drugimi kontrolnimi vzorci, da se ugotovi, ali topilo/vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

Pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne bi smela biti previsoka.

Prehapteni: kemikalije, ki postanejo povzročitelji preobčutljivosti kože z abiotsko pretvorbo.

Prohapteni: kemikalije, ki potrebujejo encimsko aktivacijo za uresničitev potenciala za povzročanje preobčutljivosti kože.

Relativna intenziteta fluorescence (RFI): relativne vrednosti geometrijske sredine intenzitete fluorescence (MFI) pri celicah, tretiranih s kemikalijo, v primerjavi z MFI pri celicah, tretiranih s topilom/vehiklom.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusa (21).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusa v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (21).

Ponovitev: ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušanih sočasno s kontrolo s topilom/vehiklom in pozitivno kontrolo.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (21).

Pufer za barvanje: fosfatni pufer s soljo, ki vsebuje 0,1 % govejega serumskega albumina.

Kontrola s topilom/vehiklom: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema razen preskusne kemikalije, vključuje pa topilo/vehikel, ki se uporabi. Uporablja se za določanje izhodiščnega odziva za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno ali stabilno dispergirano v istem topilu/vehiklu. Pri preskušanju s sočasno kontrolo z gojiščem ta vzorec tudi pokaže, ali topilo/vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (21).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te metode.

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (23).

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

Veljaven preskus: preskus, ki se obravnava kot dovolj ustrezen in zanesljiv za določen namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih. Preskus ni nikoli veljaven v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom (21).

Dodatek 1.2

SNOVI ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI

Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno pridobijo napovedi h-CLAT, pričakovane za 10 snovi, ki so priporočene v preglednici 1, ter vrednosti CV75, EC150 in EC200, ki so za vsaj 8 od 10 snovi za preverjanje usposobljenosti v ustreznem referenčnem območju. Snovi za preverjanje usposobljenosti so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri nevarnostih v zvezi s povzročanjem preobčutljivosti kože. Druga merila za izbiro so bila razpoložljivost snovi na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro*, pridobljenih z metodo h-CLAT. Za metodo h-CLAT so na voljo tudi objavljeni referenčni podatki (3) (14).

Preglednica 1:

Priporočene snovi za dokazovanje tehnične usposobljenosti za metodo h-CLAT

Snovi za preverjanje usposobljenosti	Št. CAS	Agregatno stanje	Napoved <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	CV75 Referenčno območje v µg/ml ⁽²⁾	Rezultati h-CLAT za CD86 (referenčno območje EC150 v µg/ml) ⁽²⁾	Rezultati h-CLAT za CD54 (referenčno območje EC200 v µg/ml) ⁽²⁾
2,4-dinitroklorobenzen	97-00-7	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (izjemno močen)	2–12	pozitivna (0,5–10)	pozitivna (0,5–15)
4-fenilendiamin	106-50-3	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (močen)	5–95	pozitivna (< 40)	negativna (> 1,5) ⁽³⁾
nikljev sulfat	10101-97-0	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	30–500	pozitivna (< 100)	pozitivna (10–100)
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	30–400	negativna (> 10) ⁽³⁾	pozitivna (10–140)
R(+)-limonen	5989-27-5	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	> 20	negativna (> 5) ⁽³⁾	pozitivna (< 250)
imidazolidinil urea	39236-46-9	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	25–100	pozitivna (20–90)	pozitivna (20–75)
izopropanol	67-63-0	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	> 5 000	negativna (> 5 000)	negativna (> 5 000)
glicerol	56-81-5	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	> 5 000	negativna (> 5 000)	negativna (> 5 000)
mlečna kislina	50-21-5	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	1 500–5 000	negativna (> 5 000)	negativna (> 5 000)
4-aminobenzojska kislina	150-13-0	trdna snov	ne povzroča preobčutljivosti	> 1 000	negativna (> 1 000)	negativna (> 1 000)

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS).

⁽¹⁾ Napoved nevarnosti (in moči) *in vivo* temelji na podatkih za preskus LLNA (3) (14). Moč *in vivo* se izpelje s pomočjo meril, ki jih je predlagal ECETOC (24).

⁽²⁾ Na podlagi ugotovljenih vrednosti iz preteklih preskusov (13) (25).

⁽³⁾ V preteklosti so bili za ta označevalec pridobljeni večinoma negativni rezultati, zato se največkrat pričakuje negativen rezultat. Navedeno območje je bilo opredeljeno na podlagi nekaj ugotovljenih pozitivnih rezultatov v preteklosti. Če je pridobljen pozitiven rezultat, mora biti vrednost EC v navedenem referenčnem območju.

Dodatek 2

PREOBČUTLJIVOST KOŽE IN VITRO: PRESKUS AKTIVACIJE CELIČNE LINIJE U937 (U-SENS™)

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

1. S preskusom U-SENS™ se kvantificirajo spremembe v izražanju celičnega površinskega označevalca, povezanega s procesom aktivacije monocitov in dendritskih celic (DC) (tj. CD86), v celični liniji U937 humanega histiocitnega limfoma po izpostavljenosti povzročiteljem preobčutljivosti (1). Izmerjene ravni izražanja celičnega površinskega označevalca CD86 v celični liniji U937 se nato uporabijo za podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože.
2. Preskus U-SENS™ je bil ocenjen v validacijski študiji (2) pod vodstvom družbe L'Oreal in nato z neodvisnim medsebojnim strokovnim pregledom, ki ga je izvedel Znanstveni svetovni odbor (ESAC) Referenčnega laboratorija Evropske unije za alternative testiranju na živalih (EURL ECVAM) (3). Ob upoštevanju vseh razpoložljivih dokazov ter prispevkov regulatorjev in deležnikov je EURL ECVAM (4) preskus U-SENS™ priporočil za uporabo v okviru IATA za podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, zaradi razvrstitve glede na nevarnost in označevanje. OECD v smernicah za poročanje o strukturiranih pristopih k povezovanju podatkov in posameznih virov informacij, ki se uporabljajo v okviru IATA za preobčutljivost kože, obravnava številne študije primerov, ki opisujejo različne strategije preskušanja in napovedne modele. Eden od različnih opredeljenih pristopov temelji na preskusu U-SENS (5). Primeri uporabe podatkov preskusa U-SENS™ v povezavi z drugimi informacijami, vključno s preteklimi podatki in obstoječimi veljavnimi podatki za ljudi (6), so navedeni tudi druge v virih (4) (5) (7).
3. Izkazalo se je, da se lahko preskus U-SENS™ prenese v laboratorije, ki imajo izkušnje s tehnikami gojenja celičnih kultur in analizo s pretočno citometrijo. Stopnja ponovljivosti napovedi, ki jo je mogoče pričakovati pri preskusu, je v enem in več laboratorijih 90- oziroma 84-odstotna (8). Rezultati, pridobljeni z validacijsko študijo (8) in drugimi objavljenimi študijami (1), na splošno kažejo, da je v primerjavi z rezultati LLNA točnost pri razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti, 86-odstotna (N = 166), pri čemer je občutljivost 91-odstotna (118/129) in specifičnost 65-odstotna (24/37). V primerjavi z rezultati za ljudi je točnost pri razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (tj. kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti, 77-odstotna (N = 101), pri čemer je občutljivost 100-odstotna (58/58) in specifičnost 47-odstotna (20/43). Lažno negativne napovedi pri preskusu U-SENS™ v primerjavi z LLNA se bodo bolj verjetno nanašale na kemikalije z nizko do zmerno stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1B po GHS ZN/uredbi CLP) kot na kemikalije z visoko stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1A po GHS ZN/uredbi CLP) (1) (8) (9). Vse te informacije skupaj kažejo, da preskus U-SENS™ uporabno prispeva k opredelitvi nevarnosti za povzročanje preobčutljivosti kože. Vendar so tukaj navedene vrednosti točnosti za preskus U-SENS™ kot samostojni preskus zgolj okvirne, saj ga je treba obravnavati skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavkov 7 in 8 iz Splošnega uvoda. Poleg tega je treba pri ocenjevanju metod za preobčutljivost kože, ki se ne izvajajo na živalih, upoštevati, da preskus LLNA in druga testiranja na živalih ne odražajo v celoti razmer pri človeku.
4. Na podlagi trenutno razpoložljivih podatkov se je pokazalo, da se preskus U-SENS™ lahko uporablja za preskusne kemikalije (vključno s kozmetičnimi sestavinami, kot so konzervansi, površinsko aktivne snovi, aktivne snovi, barve), ki zajemajo različne organske funkcionalne skupine, fizikalno-kemijske lastnosti, stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (kot je določena v študijah *in vivo*) in spekter mehanizmov reakcije, za katere je znano, da so povezani s preobčutljivostjo kože (tj. Michaelov akceptor, nastanek Schiffove baze, sredstvo prenosa acilne skupine, bimolekularna nukleofilna substitucija [SN2] ali nukleofilna aromatska substitucija [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Preskus U-SENS™ se uporablja za preskusne kemikalije, ki so topne ali tvorijo stabilno disperzijo (tj. koloid ali suspenzija, v kateri se preskusna kemikalija ne usede ali loči od topila/vehikla v različne faze) v ustreznem topilu/vehiklu (glej odstavek 13). Kemikalije v podatkovnem nizu, za katere je bilo navedeno, da so prehapteni (tj. snovi, ki se aktivirajo z oksidacijo) ali prohapteni (tj. snovi, ki potrebujejo encimsko aktivacijo, na primer z encimi P450), so bile s preskusom U-SENS™ pravilno napovedane (1) (10). Snovi, ki povzročajo motnje membrane, lahko privedejo do lažno pozitivnih rezultatov zaradi nespecifičnega povečanja izražanja CD86, saj so bili trije od sedmih lažno pozitivnih rezultatov v zvezi z

referenčno klasifikacijo *in vivo* pri površinsko aktivnih snoveh (1). Kot take je treba pozitivne rezultate pri površinsko aktivnih snoveh obravnavati previdno, medtem ko je negativne rezultate pri površinsko aktivnih snoveh še vedno mogoče uporabiti za podporo opredelitvi preskusne kemikalije kot snovi, ki ne povzroča preobčutljivosti kože. Fluorescentne preskusne kemikalije se lahko ocenjujejo s preskusom U-SENSTM (1), vendar bodo močne fluorescentne preskusne kemikalije, ki svetlobo oddajajo na isti valovni dolžini kot fluorescein izotiocianat (FITC) ali propidijev jodid (PI), vplivale na zaznavanje s pretočno citometrijo, zato jih ni mogoče pravilno oceniti z uporabo protiteles, konjugiranih s FITC (morebitni lažno negativen rezultat), ali PI (viabilnost ni merljiva). V takem primeru se lahko uporabijo druga s fluorokromom označena protitelesa oziroma drugi označevalci citotoksičnosti, če je mogoče dokazati, da zagotavljajo podobne rezultate, kot s FITC označena protitelesa ali PI (glej odstavke 18), npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2.2. Glede na navedeno je treba pozitivne rezultate pri površinsko aktivnih snoveh in negativne rezultate pri močnih fluorescentnih preskusnih kemikalijah razlagati v okviru navedenih omejitev in skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA. Kadar obstajajo dokazi, da preskusa U-SENSTM ni mogoče uporabiti za druge specifične kategorije preskusnih kemikalij, se ta preskus zanje ne bi smel uporabiti.

5. Kot je navedeno zgoraj, preskus U-SENSTM podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože. Kadar se uporablja v celostnih pristopih, kot je IATA, pa lahko prispeva tudi k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti kože. Vendar je potrebno nadaljnje delo, ki po možnosti temelji na podatkih za ljudi, da se določi, kako bi lahko rezultati preskusa U-SENSTM prispevali k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti.
6. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 2.1.

NAČELO PRESKUSA

7. Preskus U-SENSTM je preskus *in vitro*, s katerim se kvantificirajo spremembe v izražanju celičnega površinskega označevalca CD86 na celični liniji humanega histiocitnega limfoma, tj. celicah U937, po 45 ± 3 -urni izpostavljenosti preskusni kemikaliji. Površinski označevalec CD86 je tipični označevalec aktivacije celic U937. Za CD86 je znano, da je kostimulatorna molekula, ki lahko posnema aktivacijo monocitov, ta pa ima ključno vlogo pri označevanju celic T. Spremembe v izražanju celičnega površinskega označevalca CD86 se merijo s pretočno citometrijo po obarvanju celic, običajno s protitelesi, označenimi s fluorescein izotiocianatom (FITC). Sočasno se tudi izmeri citotoksičnost (npr. z uporabo PI), da se oceni, ali se pri subcitotoksičnih koncentracijah pojavi povečano izražanje celičnega površinskega označevalca CD86. Izračuna se stimulacijski indeks (SI) celičnega površinskega označevalca CD86 v primerjavi s kontrolo s topilom/vehiklom in uporabi v napovednem modelu (glej odstavek 19), da se podpre razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti.

DOKAZOVANJE USPOSABLJENOSTI

8. Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da v skladu z dobrimi praksami metode *in vitro* (11) uporabijo 10 snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 2.2. Poleg tega morajo uporabniki preskusov vzdrževati zbirko preteklih podatkov, pridobljenih s preverjanji reaktivnosti (glej odstavek 11) ter pozitivnimi kontrolami in kontrolami s topilom/vehiklom (glej odstavka 15 in 16), ter te podatke uporabiti za potrditev, da se v njihovem laboratoriju vzdržuje obnovljivost preskusa skozi čas.

POSTOPEK

9. Ta preskus temelji na protokolu št. 183 storitve za podatkovne zbirke o alternativnih metodah namesto testiranja na živalih (DataBase service on Alternative Methods to animal experimentation (DB-ALM)) za preskus U-SENSTM (12). Pri izvajanju in uporabi preskusa U-SENSTM v laboratoriju je treba uporabljati standardne delovne postopke. Uporabi se lahko avtomatiziran sistem za izvajanje preskusa U-SENSTM, če je mogoče dokazati, da zagotavlja podobne rezultate, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2.2. V nadaljevanju so opisani glavni elementi in postopki za preskus U-SENSTM.

Priprava celic

10. Za izvedbo preskusa U-SENS™ je treba uporabiti celično linijo humanega histiocitnega limfoma, U937 (13). Celice (klon CRL1593.2) je treba pridobiti iz celične banke z dobrimi kvalifikacijami, kot je American Type Culture Collection.
11. Celice U937 se gojijo pri 37 °C v navlaženi atmosferi s 5 % CO₂ v gojišču RPMI-1 640, dopolnjenem z 10 % telečjega fetalnega seruma (FCS), 2 mM L-glutamina, 100 enotami/ml penicilina in 100 µg/ml streptomicina (kompletno gojišče). Celice U937 se rutinsko pasažirajo na 2 do 3 dni z gostoto od 1,5 oziroma 3×10^5 celic/ml. Gostota celic ne bi smela presegati 2×10^6 celic/ml, viabilnost celic, izmerjena z izključitvenim testom z barvilom tripan modro, pa mora biti ≥ 90 % (ne sme se uporabiti pri prvi pasaži po odtajanju). Preden se celice uporabijo za preskušanje, je treba vsako serijo celic, FCS ali protiteles kvalificirati s preverjanjem reaktivnosti. Reaktivnost celic je treba preveriti z uporabo pozitivne kontrole, tj. pikrilsulfonske kisline (2,4,6-trinitro-benzen-sulfonska kislina: TNBS) (št. CAS 2 508-19-2, $z \geq 99$ -odstotno čistostjo), in negativne kontrole, tj. mlečne kisline (LA) (št. CAS 50-21-5, $z \geq 85$ -odstotno čistostjo), najmanj en teden po odtajanju. Za preverjanje reaktivnosti je treba za vsako od dveh kontrol preskusiti šest končnih koncentracij (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml in LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). TNBS, raztopljena v kompletnem gojišču, bi morala povzročiti pozitiven in s koncentracijo povezan odziv CD86 (npr. kadar pozitivni koncentraciji, SI CD86 ≥ 150 , sledi koncentracija z naraščajočim SI CD86), LA, raztopljena v kompletnem gojišču, pa bi morala povzročiti negativen odziv CD86 (glej odstavek 21). Za poskus se lahko uporabi samo serija celic, ki so dvakrat uspešno prestale preverjanje reaktivnosti. Celice se lahko namnožujejo do sedem tednov po odtajanju. Število pasaž ne sme presegati 21. Preverjanje reaktivnosti je treba izvesti v skladu s postopki, opisanimi v odstavkih od 18 do 22.
12. Za preskušanje se celice U937 nasadijo z gostoto bodisi 3×10^5 celic/ml bodisi 6×10^5 celic/ml in predhodno gojijo v stekleničkah za gojenje celičnih kultur dva dni oziroma en dan. Poleg zgoraj opisanih pogojev predhodnega gojenja se lahko uporabijo tudi drugi, če je zagotovljena zadostna znanstvena utemeljitev in je mogoče dokazati, da dajejo podobne rezultate, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2.2. Na dan preskusa se celice, odvzete iz stekleničke za gojenje celičnih kultur, znova suspendirajo v svežem gojišču z gostoto 5×10^5 celic/ml. Nato se celice nanesejo na 96-jamično ploščo z ravnim dnom po 100 µl (končna gostota celic je $0,5 \times 10^5$ celic/jamico).

Priprava preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi

13. Pred preskusom se opravi ocena topnosti. V ta namen se preskusne kemikalije raztopijo ali stabilno dispergirajo pri koncentraciji 50 mg/ml v kompletnem gojišču kot prvi možnosti topila ali dimetil sulfoksidu (DMSO, $z \geq 99$ -odstotno čistostjo) kot drugi možnosti topila/vehikla, če preskusna kemikalija ni topna v topilu/vehiklu kompletnega gojišča. Za preskus se preskusna kemikalija raztopi do končne koncentracije 0,4 mg/ml v kompletnem gojišču, če je kemikalija topna v tem topilu/vehiklu. Če je kemikalija topna samo v DMSO, se raztopi pri koncentraciji 50 mg/ml. Poleg zgoraj opisanih topil/vehiklov se lahko uporabijo tudi drugi, če je zagotovljena zadostna znanstvena utemeljitev. Upoštevati je treba stabilnost preskusne kemikalije v končnem topilu/vehiklu.
14. Preskusne kemikalije in kontrolne snovi se pripravijo na dan preskusa. Ker se poskus za ugotavljanje odmerka ne izvede, je treba za prvo ponovitev preskusiti šest končnih koncentracij (1, 10, 20, 50, 100 in 200 µg/ml) v ustreznem topilu/vehiklu bodisi v kompletnem gojišču bodisi v 0,4 % DMSO v gojišču. Za nadaljnje ponovitve se z raztopinami preskusne kemikalije, ki se začnejo pri 0,4 mg/ml v kompletnem gojišču ali 50 mg/ml v DMSO, z uporabo ustreznega topila/vehikla pripravijo vsaj štiri delovne raztopine (tj. vsaj štiri koncentracije). Delovne raztopine se nazadnje uporabijo za tretiranje, tako da se količini delovne raztopine na plošči doda enaka količina suspenzije celic U937 (glej odstavek 11 zgoraj), da se doseže nadaljnja dvakratna razredčitev (12). Koncentracije (najmanj štiri) za kakršno koli nadaljnjo ponovitev se izberejo na podlagi posameznih rezultatov vseh prejšnjih ponovitev (8). Uporabne končne koncentracije so 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 in 200 µg/ml. Najvišja končna koncentracija je 200 µg/ml. Če je pozitivna vrednost CD86 ugotovljena pri 1 µg/ml, potem se oceni 0,1 µg/ml, da se poišče koncentracija preskusne kemikalije, ki ne sproži CD86 nad pozitivnim pragom. Za vsako ponovitev se izračuna EC150 (koncentracija, pri kateri kemikalija doseže pozitivni prag CD86 v višini 150 %, glej odstavek 19), če je ugotovljen pozitiven odziv CD86, povezan s koncentracijo. Kadar preskusna kemikalija povzroči pozitiven odziv CD86, ki ni povezan s koncentracijo, izračun

EC150 morda ne bo relevanten, kot je opisano v protokolu U-SENS™ DB-ALM št. 183 (12). Kadar je to mogoče, se za vsako ponovitev izračuna CV70 (koncentracija, pri kateri kemikalija doseže 70-odstotni prag citotoksičnosti, glej odstavek 19) (12). Za preiskavo učinka odziva na koncentracijo za povečanje CD86 je treba vse koncentracije iz uporabnih koncentracij izbrati tako, da so enakomerno razporejene med EC150 (ali najvišjo necitotoksično koncentracijo, pri kateri je CD86 negativen) in CV70 (ali najvišjo dopustno koncentracijo, tj. 200 µg/ml). Za primerjavo je treba preskusiti najmanj štiri koncentracije na ponovitev, pri čemer morata biti vsaj dve koncentraciji enaki kot pri predhodnih ponovitvah.

15. Kontrola s topilom/vehiklom, uporabljena pri preskusu U-SENS™, je kompletno gojišče (za preskusne kemikalije, raztopljene ali stabilno dispergirane v kompletnem gojišču) (glej odstavek 4) ali 0,4 % DMSO v kompletnem gojišču (za preskusne kemikalije, raztopljene ali stabilno dispergirane v DMSO).
16. Pozitivna kontrola, uporabljena pri preskusu U-SENS™, je TNBS (glej odstavek 11), pripravljena v kompletnem gojišču. TNBS je treba kot pozitivno kontrolo za meritev izražanja CD86 uporabiti pri enotni končni koncentraciji na plošči (50 µg/ml), pri kateri je viabilnost celic več kot 70-odstotna. Za 50 µg/ml koncentracije TNBS na plošči se pripravi 1 M (tj. 293 mg/ml) osnovna raztopina TNBS v kompletnem gojišču in nadalje 2 930-krat razredči s kompletnim gojiščem v 100 µg/ml delovno raztopino. Mlečno kislino (LA, CAS 50-21-5) je treba uporabiti kot negativno kontrolo pri 200 µg/ml, raztopljenih v kompletnem gojišču (iz 0,4 mg/ml osnovne raztopine). Na vsaki plošči vsake ponovitve se pripravijo trije ponovljeni vzorci netretirane kontrole s kompletnim gojiščem, kontrole s topilom/vehiklom ter negativne in pozitivne kontrole (12). Uporabijo se lahko tudi druge primerne pozitivne kontrole, če so na voljo podatki iz preteklih preskusov za izpeljavo primerljivih meril za sprejemljivost ponovitev. Merila za sprejemljivost ponovitev so enaka kot merila, opisana za preskusno kemikalijo (glej odstavek 12).

Nanos preskusnih kemikalij in kontrolnih snovi

17. Kontrola s topilom/vehiklom ali delovne raztopine, opisane v odstavkih od 14 do 16, se zmešajo v razmerju 1: 1 (v/v) s suspenzijami celic, pripravljenimi na 96-jamnični plošči z ravnim dnom (glej odstavek 12). Obdelane plošče se nato inkubirajo 45 ± 3 ure pri 37 °C v prisotnosti 5 % CO₂. Pred inkubacijo se plošče zatesnijo s polprepustno membrano, da se prepreči izhlapevanje hlapnih preskusnih kemikalij in navzkrižna kontaminacija med celicami, tretiranimi s preskusnimi kemikalijami (12).

Barvanje celic

18. Po 45 ± 3 -urni izpostavljenosti se celice prenesejo na mikrotitrsko ploščo z jamicami v obliki črke V in zberejo s centrifugiranjem. Interferenca topnosti je opredeljena kot kristali ali kapljice, opažene pod mikroskopom 45 ± 3 ure po tretiranju (pred barvanjem celic). Supernatanti se zavržejo, preostale celice pa se enkrat sperejo s 100 µl ledeno mrzlega fosfatnega pufru s soljo (PBS), ki vsebuje 5 % telečjega fetalnega seruma (pufer za barvanje). Po centrifugiranju se celice znova suspendirajo s 100 µl pufru za barvanje in 30 minut barvajo s 5 µl (npr. 0,25 µg) s FITC označenih protiteles anti-CD86 ali mišjih protiteles (izotipa) IgG1 pri 4 °C, pri čemer so zaščitene pred svetlobo. Uporabiti je treba protitelesa, opisana v protokolu U-SENS™ DB-ALM št. 183 (12) (za CD86: BD-PharMingen #5556 57 klon: Fun-1, ali Caltag/Invitrogen # MHCD8601 klon: BU63; in za IgG1: BD-PharMingen #5557 48 ali Caltag/Invitrogen # GM4992). Na podlagi izkušenj razvijalcev preskusov je intenziteta fluorescence protiteles med različnimi serijami običajno konsistentna. Za poskus se lahko uporabijo tudi drugi kloni ali dobavitelji protiteles, ki so uspešno prestali preverjanje reaktivnosti (glej odstavek 11). Vendar lahko uporabniki razmislijo o titraciji protiteles v pogojih lastnega laboratorija, da se opredeli najboljša koncentracija za uporabo. Uporabijo se lahko tudi drugi sistemi zaznavanja, npr. s fluorokromom označena protitelesa anti-CD86, če je mogoče dokazati, da dajejo podobne

rezultate kot s FITC konjugirana protitelesa, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2.2. Po dvakratnem spiranju s 100 µl pufru za barvanje in enkratnem spiranju s 100 µl ledeno mrzlega PBS se celice znova suspendirajo v ledeno mrzlem PBS (npr. 125 µl za vzorce, ki se analizirajo ročno po posameznih epruvetah, ali 50 µl, če se uporablja avtomatski vzorčevalnik) in doda se raztopina PI (končna koncentracija 3 µg/ml). Uporabijo se lahko drugi označevalci citotoksičnosti, kot je 7-aminoactinomycin D (7-AAD) ali tripan modro, če je mogoče dokazati, da alternativna barvila dajejo podobne rezultate kot PI, na primer s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti iz Dodatka 2.2.

Analiza s pretočno citometrijo

19. Raven izražanja CD86 in viabilnost celic se analizirata s pretočno citometrijo. Celice se prikažejo v točkovnem diagramu velikosti (FSC) in granuliranosti (SSC) na logaritemski skali, da se jasno opredeli populacija pri prvih vratih R1 in izločijo drobci. Za vsako jamico pri vratih R1 je cilj pridobiti 10 000 celic. Celice pri istih vratih R1 so prikazane v točkovnem diagramu FL3 ali FL4/SSC. Viabilne celice se prikažejo s postavitvijo drugih vrat R2, s čimer se izbere populacija celic, ki ne reagirajo na propidijev jodid (kanal FL3 ali FL4). Viabilnost celic se lahko izračuna z naslednjo enačbo v citometrijskem analiznem programu. Kadar je viabilnost celic majhna, se lahko pridobi do 20 000 celic, vključno z mrtvimi celicami. Alternativno se lahko podatki zajemajo eno minuto po začetku analize.

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{Number of living cells}}{\text{Total Number of acquired cells}} \times 100$$

Delež FL1-pozitivnih celic se nato izmeri med temi viabilnimi celicami pri vratih R2 (znotraj R1). Izražanje CD86 na površini celic se analizira v točkovnem diagramu FL1/SSC v okviru vrat za viabilne celice (R2).

Za jamice s kompletnim gojiščem/IgG1 se analizni označevalec nastavi blizu glavni populaciji, tako da imajo kontrole s kompletnim gojiščem IgG1 v ciljnem območju od 0,6 do 0,9 %.

Barvna interferenca je opredeljena kot sprememba točkovnega diagrama s FITC označenih IgG1 (geo. sr. SI FL1 IgG1 ≥ 150 %).

Stimulacijski indeks (SI) CD86 za kontrolne celice (netretirane ali v 0,4 % DMSO) in celice, tretirane s kemikalijo, se izračuna v skladu z naslednjo enačbo:

$$S.I. = \frac{\% \text{ of CD86}^+ \text{ treated cells} - \% \text{ of IgG1}^+ \text{ treated cells}}{\% \text{ of CD86}^+ \text{ control cells} - \% \text{ of IgG1}^+ \text{ control cells}} \times 100$$

% netretiranih kontrolnih celic IgG1⁺: delež FL1-pozitivnih celic IgG1, opredeljenih z analiznim označevalcem (sprejemljiv razpon $\geq 0,6$ % in $< 1,5$ %, glej odstavek 22), med viabilnimi netretiranimi celicami.

% kontrolnih/tretiranih celic IgG1⁺/CD86⁺: delež FL1-pozitivnih celic IgG1/CD86, izmerjen brez premikanja analiznega označevalca med viabilnimi kontrolnimi/tretiranimi celicami.

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

20. Pri preskusu U-SENSTM se izračunata naslednja parametra: vrednost CV70, tj. koncentracija, pri kateri se pokaže 70-odstotno preživetje celic U937 (30-odstotna citotoksičnost), in vrednost EC150, tj. koncentracija, pri kateri so preskusne kemikalije povzročile stimulacijski indeks (SI) CD86 150 %.

CV70 se izračuna z log-linearno interpolacijo z naslednjo enačbo:

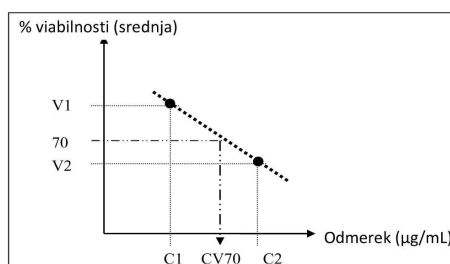
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

pri čemer je:

V1 najnižja vrednost viabilnosti celic nad 70 %,

V2 najvišja vrednost viabilnosti celic pod 70 %,

C1 in C2 sta koncentraciji, pri katerih se pokaže vrednost viabilnosti celic V1 oziroma V2.



Za pridobitev CV70 se lahko uporabijo tudi drugi pristopi, če se dokaže, da to ne vpliva na rezultate (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti).

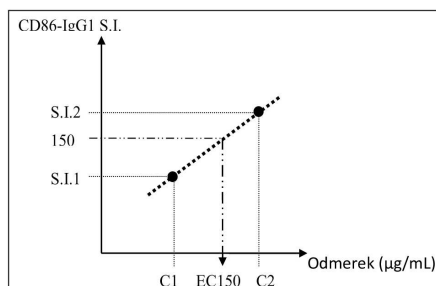
EC150 se izračuna z log-linearno interpolacijo z naslednjo enačbo:

$$EC150 = C1 + [(150 - SI\ 1) / (SI\ 2 - SI\ 1) * (C2 - C1)]$$

pri čemer je:

C1 najvišja koncentracija v µg/mL s SI CD86 > 150 % (SI 1),

C2 najnižja koncentracija v µg/mL s SI CD86 ≥ 150 % (SI 2).

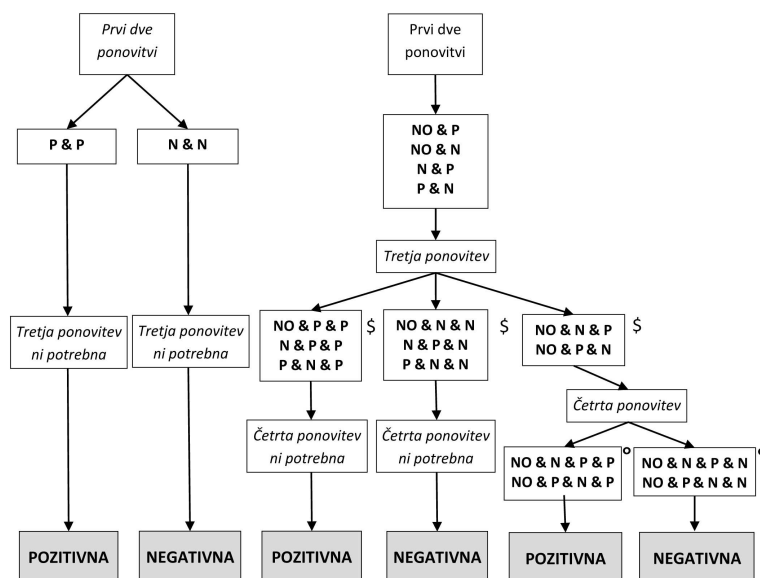


Vrednosti EC150 in CV70 se izračunata

- za vsako ponovitev: posamezne vrednosti EC150 in CV70 se uporabijo kot orodja za preiskavo učinka odziva na koncentracijo za povečanje CD86 (glej odstavek 14);
- na podlagi povprečnih viabilnosti se določi skupna CV70 (12);
- na podlagi povprečnih vrednosti SI CD86 se določi skupna EC150 za preskusno kemikalijo, ki je s preskusom U-SENS™ napovedana kot POZITVNA (glej odstavek 21) (12).

Napovedni model

21. Za meritev izražanja CD86 se vsaka preskusna kemikalija preskusi v najmanj štirih koncentracijah in najmanj dveh neodvisnih ponovitvah (opravljenih na drug dan), iz katerih se izpelje ena sama napoved (NEGATIVNA ali POZITIVNA).
- Posamezna sklepna ugotovitev ponovitve v preskusu U-SENS™ se obravnava kot negativna (v nadaljnjem besedilu: N), če je SI CD86 manjši od 150 % pri vseh necitotoksičnih koncentracijah (viabilnost celic ≥ 70 %) in če ni ugotovljena nobena interferenca (citotoksičnost, topnost: glej odstavek 18; ali barva: glej odstavek 19 ne glede na to, pri katerih necitotoksičnih koncentracijah je interferenca zaznana). V vseh drugih primerih: če je SI CD86 večji od ali enak 150 % in/ali so ugotovljene interference, se posamezna sklepna ugotovitev ponovitve v preskusu U-SENS™ obravnava kot pozitivna (v nadaljnjem besedilu: P).
 - Napoved U-SENS™ se obravnava kot NEGATIVNA, če sta vsaj dve neodvisni ponovitvi negativni (N) (slika 1). Če sta obe prvi ponovitvi negativni (N), se napoved U-SENS™ obravnava kot NEGATIVNA, tretje ponovitve pa ni treba izvesti.
 - Napoved U-SENS™ se obravnava kot POZITIVNA, če sta vsaj dve neodvisni ponovitvi pozitivni (P) (slika 1). Če sta obe prvi ponovitvi pozitivni (P), se napoved U-SENS™ obravnava kot POZITIVNA, tretje ponovitve pa ni treba izvesti.
 - Ker se poskus za ugotavljanje odmerka ne izvede, obstaja izjema, če je v prvi ponovitvi SI CD86 večji od 150 % ali enak 150 % samo pri najvišji necitotoksični koncentraciji. Za ponovitev se nato šteje, da je NEOPREDELJIVA (NO), tako da je treba preskusiti dodatne koncentracije (med najvišjo necitotoksično koncentracijo in najnižjo citotoksično koncentracijo – glej odstavek 20) v dodatnih ponovitvah. Če je ponovitev opredeljena kot NO, je treba izvesti najmanj dve dodatni ponovitvi in še četrto ponovitev, če druga in tretja ponovitev nista skladni (N in/ali P neodvisno) (slika 1). Nadaljnje ponovitve bodo obravnavane kot pozitivne, tudi če je CD86 enak ali večji od 150 % samo pri eni necitotoksični koncentraciji, ker je bila koncentracija prilagojena specifični preskusni kemikaliji. Končna napoved bo temeljila na večinskem rezultatu treh ali štirih posameznih ponovitev (tj. dveh od treh ali dveh od štirih) (slika 1).



Slika 1: Napovedni model, uporabljen pri preskusu U-SENS™. Napoved U-SENS™ je treba obravnavati v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavka 4 ter odstavkov 7, 8 in 9 iz Splošnega uvoda.

N: ponovitev, pri kateri CD86 ni pozitiven ali interferenca ni ugotovljena;

P: ponovitev, pri kateri je CD86 pozitiven in/ali so interference ugotovljene;

NO: neopredeljiva. Prva ponovitev brez dokončne ugotovitve, kadar je CD86 pozitiven samo pri najvišji necitotoksični koncentraciji;

#: Posamezna neopredeljiva (NO) sklepna ugotovitev, pripisana samo prvi ponovitvi, samodejno vodi do tega, da je treba izvesti tretjo ponovitev, da se doseže večina pozitivnih (P) ali negativnih (N) sklepnih ugotovitev v vsaj dveh od treh neodvisnih ponovitev.

\$: Okenca prikazuje ustrezne kombinacije rezultatov iz treh ponovitev na podlagi rezultatov, pridobljenih v prvih dveh ponovitvah, prikazanih v zgornjem okencu.

°: Okenca prikazuje ustrezne kombinacije rezultatov iz štirih ponovitev na podlagi rezultatov, pridobljenih v prvih treh ponovitvah, prikazanih v zgornjem okencu.

Merila za sprejemljivost

22. Pri uporabi preskusa U-SENS™ morajo biti izpolnjena naslednja merila za sprejemljivost (12).

- Po koncu 45 ± 3 -urne izpostavljenosti mora biti srednja viabilnost tripleta netretiranih celic U937 $> 90 \%$, v izražanju CD86 pa ni ugotovljen noben odmik. Bazalno izražanje CD86 pri netretiranih celicah U937 mora biti v območju $\geq 2 \%$ in $\leq 25 \%$.
- Kadar se kot topilo uporabi DMSO, se veljavnost kontrole z vehiklom DMSO oceni z izračunom SI DMSO v primerjavi z netretiranimi celicami, srednja viabilnost tripleta celic pa je morala biti $> 90 \%$. Kontrola z vehiklom DMSO je veljavna, če je bila srednja vrednost SI CD86 njenega tripleta nižja od 250% srednjega SI CD86 tripleta netretiranih celic U937.
- Ponovitve se štejejo za veljavne, če sta bili vsaj dve od treh vrednosti IgG1 netretiranih celic U937 v območju $\geq 0,6 \%$ in $< 1,5 \%$.
- Sočasno preskušena negativna kontrola (mlečna kislina) se šteje za veljavno, če sta bila vsaj dva od treh ponovljenih vzorcev negativna (SI CD86 $< 150 \%$) in necitotoksična (viabilnost celic $\geq 70 \%$).
- Pozitivna kontrola (TNBS) se šteje za veljavno, če sta bila vsaj dva od treh ponovljenih vzorcev pozitivna (SI CD86 $\geq 150 \%$) in necitotoksična (viabilnost celic $\geq 70 \%$).

Poročilo o preskusu

23. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija

Snov iz ene sestavine:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;

- fizični videz, topnost v kompletnem gojišču, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;
- fizični videz, topnost v kompletnem gojišču, topnost v DMSO in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
- molekulska masa ali navidezna molekulska masa v primeru zmesi/polimerov z znano sestavo ali drugi podatki, pomembni za izvedbo študije;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- fizični videz, topnost v DMSO, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo in če je ustrezno;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;

- sklicevanje na rezultate pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev, če je to ustrezno.

Negativna kontrola in kontrola s topilom/vehiklom:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- fizični videz, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če se uporabijo druga kontrolna topila/vehikli razen tistih, ki so navedeni v smernici za preskušanje, in če so na voljo;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo.

Preskusni pogoji:

- ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;
- opis uporabljenega preskusa;
- uporabljena celična linija, pogoji njenega hranjenja in vir (npr. laboratorij, ki jo je zagotovil);
- uporabljena pretočna citometrija (npr. model), vključno z nastavitvami instrumenta, protitelesi in uporabljenim označevalcem citotoksičnosti;
- postopek, uporabljen za dokazovanje usposobljenosti laboratorija v zvezi z izvedbo preskusa s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti, in postopek, uporabljen za prikaz ponovljivosti izvedbe preskusa v daljšem časovnem obdobju, npr. podatki o kontrolah iz preteklih preskusov in/ali podatki iz preteklih preverjanj reaktivnosti.

Merila za sprejemljivost preskusa:

- viabilnost celic in vrednosti SI CD86, pridobljene s kontrolo s topilom/vehiklom, v primerjavi z območji sprejemljivosti;
- viabilnost celic in vrednosti SI, pridobljene s pozitivno kontrolo, v primerjavi z območji sprejemljivosti;
- viabilnost celic vseh preskušanih koncentracij preskušene kemikalije.

Preskusni postopek:

- uporabljeno število ponovitev;
- uporabljene koncentracije preskusnih kemikalij, nanašanje in čas izpostavljenosti (če je drugačen od priporočenega);
- trajanje izpostavljenosti;

- opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitve;
- opis vseh prilagoditev preskusnega postopka.

Rezultati:

- preglednice s podatki, ki vključujejo vrednost CV70 (če je ustrezno), vrednosti viabilnosti celic in vrednosti EC150 (če je ustrezno), pridobljene za preskusno kemikalijo in pozitivno kontrolo v vsaki ponovitvi, ter indikacija ocene preskusne kemikalije glede na napovedni model;
- opis kakršnih koli drugih pomembnih opažanj, če je ustrezno.

Razprava o rezultatih:

- razprava o rezultatih, pridobljenih s preskusom U-SENS™;
- obravnavanje rezultatov v okviru IATA, če so na voljo druge pomembne informacije.

Sklepne ugotovitve**VIRI**

- (1) Piroird, C., Ovigne, J. M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901–916.
- (2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Na voljo na: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
- (3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Na voljo na: [<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705>].
- (4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Na voljo na: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment (št. 256), ENV/JM/MONO(2016)29. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337–351.
- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373–382.
- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehn, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259–270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1 683–1 696.
- (11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECDFinalDraftGIVIMP.pdf>.
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33 str. Na voljo na: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565–577.
- (14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) Združeni narodi (ZN) (2015). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, šesta revidirana izdaja, New York in Ženeva: United Nations Publications. Na voljo na: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment (št. 168): The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Bruselj. Na voljo na: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Dodatek 2.1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusa s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusa in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz skladnost se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravih rezultatov preskusa (14).

Potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP): zaporedje dogodkov od kemijske strukture ciljne kemikalije ali skupine podobnih kemikalij prek začetnega dogodka na molekularni ravni do preiskovanega rezultata *in vivo* (15).

Koncentracijski odziv CD86: obstaja odvisnost od koncentracije (ali odziv na koncentracijo), kadar pozitivni koncentraciji (SI CD86 $\geq$ 150) sledi koncentracija z naraščajočim SI CD86).

Kemikalija: snov ali zmes.

CV70: ocenjena koncentracija, pri kateri je viabilnost celic 70-odstotna.

Odmik: odmik je opredeljen tako (i) popravljena vrednost %CD86⁺ netretiranega kontrolnega ponovljenega vzorca 3 je nižja od 50 % srednje vrednosti popravljene vrednosti %CD86⁺ netretiranih kontrolnih ponovljenih vzorcev 1 in 2; ter (ii) popravljena vrednost %CD86⁺ negativnega kontrolnega ponovljenega vzorca 3 je nižja od 50 % srednje vrednosti popravljene vrednosti %CD86⁺ negativnih kontrolnih ponovljenih vzorcev 1 in 2.

EC150: ocenjene koncentracije, pri katerih je SI izražanja CD86 150 %.

Pretočna citometrija: citometrična tehnika, pri kateri celice, suspendirane v tekočini, vsaka posebej potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe, ki se razprši v vzorcih, značilnih za celice in njihove komponente; celice se pogosto označijo s fluorescentnimi označevalci, tako da se svetloba najprej absorbira in nato oddaja pri spremenjenih frekvencah.

Nevarnost: neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki lahko ob izpostavljenosti temu sredstvu povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment = celostni pristop k testiranju in ocenjevanju): struktuiran pristop, ki se uporablja za ugotavljanje nevarnosti (potencial), opredeljevanje nevarnosti (moč) in/ali oceno varnosti (potencial/moč in izpostavljenost) kemikalije ali skupine kemikalij ter strateško zajame in oceni vse pomembne podatke, da se lahko sprejme regulativna odločitev v zvezi z morebitno nevarnostjo in/ali tveganjem in/ali potrebo po nadaljnjem, ciljno usmerjenem in s tem minimalnem preskušanju.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

Pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti previsoka.

Prehapteni: kemikalije, ki postanejo povzročitelji preobčutljivosti kože z abiotsko pretvorbo, npr. oksidacijo.

Prohapteni: kemikalije, ki potrebujejo encimsko aktivacijo, da bi uresničevale potencial za povzročanje preobčutljivosti kože.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusa (14).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusa v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (14).

Ponovitev: ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušanih sočasno s kontrolo s topilom/vehiklom in pozitivno kontrolo.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (14).

SI: stimulacijski indeks. Relativne vrednosti geometrijske srednje vrednosti intenzitete fluorescence pri celicah, tretiranih s kemikalijo, v primerjavi s celicami, tretiranimi s topilom.

Kontrola s topilom/vehiklom: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema razen preskusne kemikalije, vključuje pa topilo/vehikel, ki se uporabi. Uporablja se za določanje izhodiščnega odziva za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno ali stabilno dispergirano v istem topilu/vehiklu. Pri preskušanju s sočasno kontrolo z gojiščem ta vzorec tudi pokaže, ali topilo/vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (14).

Pufer za barvanje: fosfatni pufer s soljo, ki vsebuje 5 % telečjega fetalnega seruma.

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo tega preskusa.

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (16).

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

Veljaven preskus: preskus, ki se obravnava kot dovolj ustrezen in zanesljiv za določen namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih. Preskus ni nikoli veljaven v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom (14).

Dodatek 2.2

SNOVI ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI

Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pravilno pridobijo napovedi U-SENS™, pričakovane za 10 snovi, ki so priporočene v preglednici 1, ter vrednosti CV70 in EC150, ki so za vsaj 8 od 10 snovi za preverjanje usposobljenosti v ustreznem referenčnem območju. Snovi za preverjanje usposobljenosti so bile izbrane, ker predstavljajo celoten razpon odzivov pri nevarnostih v zvezi s povzročanjem preobčutljivosti kože. Druga merila za izbiro so bila razpoložljivost snovi na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro*, pridobljenih s preskusom U-SENS™. Za preskus U-SENS™ so na voljo tudi objavljeni referenčni podatki (1) (8).

Preglednica 1

Priporočene snovi za dokazovanje tehnične usposobljenosti za preskus U-SENS™

Snovi za preverjanje usposobljenosti	Št. CAS	Agregatno stanje	Napoved <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	U-SENS Topilo/vehikel	U-SENS CV70 Referenčno območje v µg/ml ⁽²⁾	U-SENS EC150 Referenčno območje v µg/ml ⁽²⁾
4-fenilendiamin	106-50-3	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (močen)	kompletno gojišče ⁽³⁾	< 30	pozitivna (≤ 10)
pikrilsulfonska kislina	2508-19-2	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (močen)	kompletno gojišče	> 50	pozitivna (≤ 50)
dietil maleat	141-05-9	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	DMSO	10–100	pozitivna (≤ 20)
rezorcinol	108-46-3	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	kompletno gojišče	> 100	pozitivna (≤ 50)
cimetov alkohol	104-54-1	trdna snov	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	DMSO	> 100	pozitivna (10–100)
4-alilanzol	140-67-0	tekočina	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	DMSO	> 100	pozitivna (< 200)
saharin	81-07-2	trdna snov	ne povzroča preobčutljivosti	DMSO	> 200	negativna (> 200)
glicerol	56-81-5	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	kompletno gojišče	> 200	negativna (> 200)
mlečna kislina	50-21-5	tekočina	ne povzroča preobčutljivosti	kompletno gojišče	> 200	negativna (> 200)
salicilna kislina	69-72-7	trdna snov	ne povzroča preobčutljivosti	DMSO	> 200	negativna (> 200)

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov (CAS).

⁽¹⁾ Napoved nevarnosti (in moči) *in vivo* temelji na podatkih za preskus LLNA (1) (8). Moč *in vivo* se izpelje s pomočjo meril, ki jih je predlagal ECETOC (17).

⁽²⁾ Na podlagi ugotovljenih vrednosti iz preteklih preskusov (1) (8).

⁽³⁾ Kompletno gojišče: gojišče RPMI-1640, dopolnjeno z 10 % telečjega fetalnega seruma, 2 mM L-glutamina, 100 enotami/ml penicilina in 100 µg/ml streptomicina (8).

Dodatek 3

PREOBČUTLJIVOST KOŽE IN VITRO: PRESKUS IL-8 LUC

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

1. V nasprotju s preskusi, s katerimi se analizira izražanje celičnih površinskih označevalcev, se s preskusom IL-8-Luc kvantificirajo spremembe v izražanju IL-8, tj. citokina, povezanega z aktivacijo dendritskih celic (DC). V reporterski celični liniji IL-8, pridobljeni iz celic THP-1 (THP-G8, pridobljen iz celične linije humane akutne monocitne levkemije THP-1), se izražanje IL-8 meri po izpostavljenosti povzročiteljem preobčutljivosti (1). Izražanje luciferaze se nato uporabi v podporo razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože.
2. Preskus IL-8 Luc je bil ocenjen v validacijski študiji (2), ki so jo izvedli Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods (japonski center za validacijo alternativnih metod (JaCVAM), **ministrstvo za gospodarstvo, trgovino in industrijo** (MGTO) in Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments (**japonska družba za alternativne poskusom na živalih**) (JSAAE), nato pa še z neodvisnim medsebojnim strokovnim pregledom (3) pod vodstvom JaCVAM ter ministrstva za zdravje, delo in blaginjo (MZDB) ob podpori **International Cooperation on Alternative Test Methods** (mednarodno sodelovanje pri alternativnih preskusnih metodah) (ICATM). Ob upoštevanju vseh razpoložljivih dokazov ter prispevkov regulatorjev in deležnikov se preskus IL-8 Luc šteje za koristen v okviru IATA za razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože, zaradi razvrstitve glede na nevarnost in označevanje. Primeri uporabe podatkov preskusa IL-8 Luc v povezavi z drugimi informacijami so navedeni v virih (4) (5) (6).
3. Izkazalo se je, da se lahko preskus IL-8 Luc prenese v laboratorije, ki imajo izkušnje s tehnikami gojenja celičnih kultur in meritvami luciferaze. Obnovljivost v enem in več laboratorijih je bila 87,7-odstotna oziroma 87,5-odstotna (2). Podatki, pridobljeni z validacijsko študijo (2), in druga objavljena dela (1) (6) kažejo, da je bilo v primerjavi z LLNA s preskusom IL-8 Luc 118 od 143 kemikalij ocenjenih kot pozitivnih ali negativnih, 25 pa kot neopredeljivih, točnost preskusa IL-8 Luc pri razlikovanju med povzročitelji preobčutljivosti kože (kategorija 1 po GHS ZN/uredbi CLP) in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti, pa je 86-odstotna (101/118), pri čemer je občutljivost 96-odstotna (92/96) in specifičnost 41-odstotna (9/22). Z izključitvijo snovi, ki ne spadajo na spodaj opisano področje uporabe (odstavek 5), je bilo s preskusom IL-8 Luc 113 od 136 kemikalij ocenjenih kot pozitivnih ali negativnih, 23 pa kot neopredeljivih, točnost preskusa IL-8 Luc pa je 89-odstotna (101/113), pri čemer je občutljivost 96-odstotna (92/96) in specifičnost 53-odstotna (9/17). Z uporabo podatkov za ljudi, navedenih v Urbisch *et al.* (7), je bilo s preskusom IL-8 Luc 76 od 90 kemikalij ocenjenih kot pozitivnih ali negativnih, 14 pa kot neopredeljivih, točnost pa je 80-odstotna (61/76), pri čemer je občutljivost 93-odstotna (54/58) in specifičnost 39-odstotna (7/18). Z izključitvijo snovi, ki ne spadajo na področje uporabe, je bilo s preskusom IL-8 Luc 71 od 84 kemikalij ocenjenih kot pozitivnih ali negativnih, 13 pa kot neopredeljivih, točnost pa je 86-odstotna (61/71), pri čemer je občutljivost 93-odstotna (54/58) in specifičnost 54-odstotna (7/13). Lažno negativne napovedi pri preskusu IL-8 Luc se bodo bolj verjetno pojavile pri kemikalijah z nizko do zmerno stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1B po GHS ZN/uredbi CLP) kot pri kemikalijah z visoko stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (tj. podkategorija 1A po GHS ZN/uredbi CLP) (6). Vse te informacije skupaj podpirajo vlogo preskusa IL-8 Luc pri opredelitvi nevarnosti za povzročanje preobčutljivosti kože. Točnost, navedena za preskus IL-8 Luc kot samostojen preskus, je zgolj okvirna, saj ga je treba obravnavati skupaj z drugimi viri informacij v okviru IATA ter v skladu z določbami odstavkov 7 in 8 iz Splošnega uvoda. Poleg tega je treba pri ocenjevanju preskusov za preobčutljivost kože, ki se ne izvajajo na živalih, upoštevati, da preskus LLNA ter druga testiranja na živalih ne odražajo v celoti razmer pri človeku.
4. Na podlagi trenutno razpoložljivih podatkov se je pokazalo, da se preskus IL-8 Luc lahko uporablja za preskusne kemikalije, ki zajemajo različne organske funkcionalne skupine, mehanizme reakcije, stopnjo povzročanja preobčutljivosti kože (kot je določena v študijah *in vivo*) ter fizikalno-kemijske lastnosti (2) (6).

5. Čeprav se pri preskusu IL-8 Luc kot topilo uporablja X-VIVO™ 15, so bile z njim pravilno ocenjene kemikalije z vrednostjo $\text{Log } K_{\text{ow}} > 3,5$ in kemikalije s topnostjo v vodi približno 100 µg/ml, kot je bila izračunana z EPI Suite™, njegova uspešnost zaznavanja povzročiteljev preobčutljivosti s slabo topnostjo v vodi pa je boljša kot pri preskusu IL-8 Luc, pri katerem se kot topilo uporabi dimetil sulfoksid (DMSO) (2). Vendar pa lahko negativni rezultati za preskusne kemikalije, ki niso topne pri 20 mg/ml, povzročijo lažno negativne rezultate, ker niso topne v X-VIVO™ 15. Zato se negativni rezultati za te kemikalije ne smejo upoštevati. V validacijski študiji je bila ugotovljena visoka lažno negativna stopnja za anhidride. Poleg tega se lahko zaradi omejene presnovne zmogljivosti celične linije (8) in poskusnih pogojev pri prohaptentih (tj. snoveh, ki potrebujejo presnovno aktivacijo) in prehaptentih (tj. snoveh, aktiviranih z oksidacijo z zrakom) v preskusu pojavijo negativni rezultati. Čeprav je treba negativne rezultate za domnevne pre/prohaptene razlagati previdno, pa je bilo s preskusom IL-8 Luc pravilno ocenjenih 11 od 11 prehaptentov, 6/6 prohaptentov ter 6/8 pre/prohaptentov v podatkovnem nizu preskusa IL-8 Luc (2). Na podlagi nedavnega obsežnega pregleda treh preskusov, ki se ne izvajajo na živalih (DPRA, KeratinoSens™ in h-CLAT), za odkrivanje prehaptentov in prohaptentov (9) ter na podlagi dejstva, da so celice THP-G8, uporabljene v preskusu IL-8 Luc, celična linija, pridobljena iz celic THP-1, ki se uporabljajo v preskusu h-CLAT, lahko preskus IL-8 Luc tudi prispeva k povečanju občutljivosti preskusov, ki se ne izvajajo na živalih, za odkrivanje prehaptentov in prohaptentov v povezavi z drugimi preskusi. Do zdaj preskušene površinsko aktivne snovi so dale (lažno) pozitivne rezultate ne glede na svojo vrsto (npr. kationske, anionske ali neionske). Nazadnje, kemikalije, ki motijo luciferazo, lahko motijo njeno aktivnost/meritev in povzročajo očitno zaviranje ali povečano luminiscenco (10). Poročalo se je na primer o tem, da koncentracije fitoestrogena, višje od 1 µM, motijo luminiscenčne signale v drugih preskusih na luciferaznem poročevalskem genu zaradi prevelike aktivacije luciferaznega poročevalskega gena. Zato je treba izražanje luciferaze, pridobljeno pri visokih koncentracijah fitoestrogenov ali spojin, ki domnevno povzročajo fitoestrogeno podobno aktivacijo luciferaznega poročevalskega gena, pazljivo preučiti (11). Glede na navedeno so površinsko aktivne snovi, anhidridi in kemikalije, ki motijo luciferazo, izključene s področja uporabe tega preskusa. Kadar obstajajo dokazi, da preskusa IL-8 Luc ni mogoče uporabiti za druge specifične kategorije preskusnih kemikalij, se ta preskus zanje ne sme uporabiti.
6. Kot je navedeno zgoraj, preskus IL-8 Luc podpira razlikovanje med povzročitelji preobčutljivosti kože in snovmi, ki niso povzročitelji preobčutljivosti kože. Potrebno je nadaljnje delo, ki po možnosti temelji na podatkih za ljudi, da bi se določilo, kako bi lahko rezultati preskusa IL-8 Luc prispevali k oceni stopnje povzročanja preobčutljivosti, kadar se obravnavajo v povezavi z drugimi viri informacij.
7. Opredelitve pojmov so navedene v Dodatku 3.1.

NAČELO PRESKUSA

8. Pri preskusu IL-8 Luc se uporabi celična linija humane monocitne levkemije, tj. THP-1, ki je bila pridobljena iz celične banke American Type Culture Collection (Manassas, Virginija, ZDA). Z uporabo te celične linije je oddelek za dermatologijo na fakulteti za medicino v Tohokuju izdelal THP-G8 reportersko celično linijo IL-8 na podlagi THP-1, ki vključuje luciferazna gena za SLO (stable luciferase orange) in SLR (stable luciferase red) pod kontrolo promotorjev IL-8 oziroma glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) (1). To omogoča kvantitativno merjenje indukcije luciferaznega gena z zaznavanjem luminiscence, pri čemer se kot kazalnik aktivnosti IL-8 in GAPDH v celicah po izpostavljenosti kemikalijam, ki povzročajo preobčutljivost, uporabijo dobro vzpostavljeni luciferazni substrati, ki oddajajo svetlobo.
9. Sistem preskusa z dvema barvama vključuje luciferazo, ki oddaja oranžno svetlobo (SLO; $\lambda_{\text{maks.}} = 580 \text{ nm}$) (12), za izražanje gena promotorja IL-8 in luciferazo, ki oddaja rdečo svetlobo (SLR; $\lambda_{\text{maks.}} = 630 \text{ nm}$) (13), za izražanje gena notranjega kontrolnega promotorja GAPDH. Luciferazi oddajata različno barvo po reakciji z d-luciferinom kresničke, njuna luminiscenca pa se izmeri sočasno v enostopenjski reakciji z delitvijo oddajanja iz zmesi za preskus z uporabo optičnega filtra (14) (Dodatek 3.2).

10. Celice THP-G8 se 16 ur tretirajo s preskusno kemikalijo, nakar se izmerita aktivnost luciferaze SLO (SLO-LA), ki izraža aktivnost promotorja IL-8, in aktivnost luciferaze SLR (SLR-LA), ki izraža aktivnost promotorja GAPDH. Zaradi lažjega razumevanja kratic sta SLO-LA in SLR-LA označeni kot IL8LA oziroma GAPLA. Preglednica 1 vsebuje opis izrazov, povezanih z aktivnostjo luciferaze v preskusu IL-8 Luc. Izmerjene vrednosti se uporabijo za izračun normalizirane IL8LA (nIL8LA), ki je razmerje med IL8LA in GAPLA; indukcije nIL8LA (Ind-IL8LA), ki je razmerje med aritmetičnimi sredinami štirikratnika izmerjenih vrednosti nIL8LA celic THP-G8, tretiranih s preskusno kemikalijo, in vrednostmi nIL8LA netretiranih celic THP-G8; in inhibicije GAPLA (Inh-GAPLA), ki je razmerje med aritmetičnimi sredinami štirikratnika izmerjenih vrednosti GAPLA celic THP-G8, tretiranih s preskusno kemikalijo, in vrednostmi GAPLA netretiranih celic THP-G8, ter uporabijo kot kazalnik za citotoksičnost.

Preglednica 1

Opis izrazov, povezanih z aktivnostjo luciferaze v preskusu IL-8 Luc

Kratice	Opredelitev
GAPLA	Aktivnost luciferaze SLR, ki izraža aktivnost promotorja GAPDH
IL8LA	Aktivnost luciferaze SLO, ki izraža aktivnost promotorja IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA celic THP-G8, tretiranih s kemikalijami/nIL8LA netretiranih celic
Inh-GAPLA	GAPLA celic THP-G8, tretiranih s kemikalijami/GAPLA netretiranih celic
CV05	Najnižja koncentracija kemikalije, pri kateri Inh-GAPLA postane < 0,05

11. Na voljo so standardi izvajanja (15), da se olajša validacija prilagojenih luciferaznih preskusov z IL-8 *in vitro*, ki so podobni preskusu IL-8 Luc, in omogoči pravočasna sprememba Smernice OECD za preskušanje 442E za njihovo vključitev. Medsebojno priznavanje podatkov OECD bo zagotovljeno le za preskuse, validirane v skladu s standardi izvajanja, če je te preskuse pregledala OECD in jih vključila v Smernico za preskušanje 442E (16).

DOKAZOVANJE USPOSABLJENOSTI

12. Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost, tako da v skladu z dobrimi praksami metode *in vitro* (17) uporabijo 10 snovi za preverjanje usposobljenosti, navedenih v Dodatku 3.3. Poleg tega morajo uporabniki preskusov vzdrževati zbirko preteklih podatkov, pridobljenih s preverjanji reaktivnosti (glej odstavek 15) ter pozitivnimi kontrolami in kontrolami s topilom/vehiklom (glej odstavke od 21 do 24), ter te podatke uporabiti za potrditev, da se v njihovem laboratoriju vzdržuje obnovljivost preskusa skozi čas.

POSTOPEK

13. Na voljo je standardni delovni postopek za preskus IL-8 Luc, ki ga je treba uporabiti pri izvajanju preskusa (18). Laboratoriji, ki želijo izvesti preskus, lahko rekombinantno celično linijo THP-G8 pridobijo od družbe GPC Lab. VCo.

Ltd., Tottori, Japonska, če podpišejo sporazum o prenosu materiala v skladu s pogoji iz predloge OECD. naslednjih odstavkih so opisani glavne sestavine in postopki preskusa.

Priprava celic

14. Za izvedbo preskusa IL-8 Luc je treba uporabiti celično linijo THP-G8 družbe GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonska (glej odstavka 8 in 13). Celice se po prejemu namnožijo (od 2 do 4 pasaže) in shranijo zamrznjene kot homogena zaloga. Celice iz te zaloge se lahko namnožujejo do največ 12 pasaž ali največ 6 tednov. Gojišče, ki se uporablja za namnoževanje, je gojišče RPMI-1640, ki vsebuje 10 % fetusnega seruma goveda (FBS), antibiotično/antimikotično raztopino (100 U/ml penicilina G, 100 µg/ml streptomicina in 0,25 µg/ml amfotericina B in 0,85 % fiziološke raztopine) (npr. GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml puomicina (npr. CAS:58-58-2) in 300 µg/ml G418 (npr. CAS:108321-42-2).
15. Preden se celice uporabijo za preskus, jih je treba kvalificirati s preverjanjem reaktivnosti. To preverjanje je treba opraviti od 1 do 2 tedna ali od 2 do 4 pasaže po odtajanju z uporabo pozitivne kontrole, tj. 4-nitrobenzil bromida (4-NBB) (CAS:100-11-8, ≥ 99 -odstotna čistost), in negativne kontrole, tj. mlečne kisline (LA) (CAS:50-21-5, ≥ 85 -odstotna čistost). 4-NBB bi moral povzročiti pozitiven odziv na Ind-IL8LA ($\geq 1,4$), medtem ko bi morala LA povzročiti negativen odziv na Ind-IL8LA ($< 1,4$). Za preskus se uporabijo samo celice, ki so uspešno prestale preverjanje reaktivnosti. Preverjanje reaktivnosti je treba izvesti v skladu s postopki, opisanimi v odstavkih od 22 do 24.
16. Za preskušanje se celice THP-G8 nasadijo z gostoto od 2 do 5×10^5 celic/ml in predhodno gojijo v stekleničkah za gojenje celičnih kultur od 48 do 96 ur. Na dan preskusa se celice odvzamejo iz stekleničke za gojenje celičnih kultur in sperejo z RPMI-1640, ki vsebuje 10 % FBS brez kakršnih koli antibiotikov, nato pa se ponovno suspendirajo v RPMI-1640, ki vsebuje 10 % FBS brez kakršnih koli antibiotikov, z gostoto 1×10^6 celic/ml. Celice se nato nanesejo na črno 96-jamično ploščo z ravnim dnom (npr. Costar Cat#3603) po 50 µl (5×10^4 celic/jamico).

Priprava preskusne kemikalije in kontrolnih snovi

17. Preskusna kemikalija in kontrolne snovi se pripravijo na dan preskusa. Za preskus IL-8 Luc se preskusne kemikalije raztopijo v X-VIVOTM 15, tj. gojišču brez seruma, ki je na voljo na trgu (Lonza, 04-418Q), do končne koncentracije 20 mg/ml. X-VIVOTM 15 se doda 20 mg preskusne kemikalije (ne glede na topnost kemikalije) v mikrocentrifugirki do količine 1 ml ter nato 30 minut energično meša in stresa na rotorju pri največji hitrosti 8 vrt/min pri sobni temperaturi približno 20 °C. Če se trdne kemikalije še vedno ne raztopijo, se epruveta ultrazvočno obdela, dokler ni kemikalija popolnoma raztopljena ali stabilno dispergirana. Pri preskusnih kemikalijah, ki so topne v X-VIVOTM 15, se raztopina razredči s faktorjem 5 z X-VIVOTM 15 in uporabi kot osnovna raztopina preskusne kemikalije z X-VIVOTM 15 (4 mg/ml). Pri preskusnih kemikalijah, ki niso topne v X-VIVOTM 15, se zmes znova rotira najmanj 30 minut in nato 5 min centrifugira pri 15000 vrt/min ($\approx 20\,000g$); nastali supernatant se uporabi kot osnovna raztopina preskusne kemikalije z X-VIVOTM 15. Če se uporabijo druga topila, kot so DMSO, voda ali gojišče, je treba njihovo uporabo znanstveno utemeljiti. Podroben postopek za raztopitev kemikalij je opisan v Dodatku 3.5. Raztopine z X-VIVOTM 15, opisane v odstavkih od 18 do 23, se zmešajo v razmerju 1: 1 (v/v) s suspenzijami celic, pripravljenimi na črni 96-jamični plošči z ravnim dnom (glej odstavek 16).
18. Prva ponovitev preskusa je namenjena določitvi citotoksične koncentracije in preučitvi potenciala kemikalij za povzročanje preobčutljivosti kože. Z uporabo X-VIVOTM 15 se osnovne raztopine preskusne kemikalije z X-VIVOTM 15 zaporedoma razredčijo s faktorjem redčenja 2 (glej Dodatek 3.5), za kar se uporabi 96-jamični preskusni blok (npr. Costar Cat#EW-01729-03). Nato se 50 µl/jamico razredčene raztopine doda 50 µl suspenzije celic na črni 96-jamični plošči z ravnim dnom. Pri preskusnih kemikalijah, ki so topne v X-VIVOTM 15, končne koncentracije preskusnih kemikalij torej segajo od 0,002 do 2 mg/ml (Dodatek 3.5). Pri preskusnih kemikalijah, ki niso topne v X-VIVOTM 15 pri 20 mg/ml, se določijo samo faktorji redčenja, ki segajo od 2 do 2^{10} , čeprav dejanske končne koncentracije preskusnih kemikalij ostanejo negotove in so odvisne od nasičene koncentracije preskusnih kemikalij v osnovni raztopini z X-VIVOTM 15.

19. V naslednjih ponovitvah preskusa (tj. drugi, tretji in četrti ponovitvi) se osnovna raztopina z X-VIVO™ 15 pripravi pri koncentraciji, ki je 4-krat višja od koncentracije viabilnosti celic 05 (CV05; najnižja koncentracija, pri kateri Inh-GAPLA postane $< 0,05$) v prvem poskusu. Če se Inh-GAPLA ne zniža pod 0,05 pri najvišji koncentraciji v prvi ponovitvi, se osnovna raztopina z X-VIVO™ 15 pripravi pri najvišji koncentraciji prve ponovitve. Koncentracija CV05 se izračuna z delitvijo koncentracije osnovne raztopine v prvi ponovitvi s faktorjem redčenja za CV05 (X) (faktor redčenja CV05 (X); faktor redčenja, potreben za razredčenje osnovne raztopine na CV05) (glej Dodatek 3.5). Za preskusne snovi, ki niso topne v X-VIVO pri 20 mg/ml, se CV05 določi s koncentracijo osnovne raztopine $\times 1/X$. Pri ponovitvah od 2 do 4 se druga osnovna raztopina pripravi kot $4 \times CV05$ (Dodatek 3.5).
20. Zaporedne razredčitve drugih osnovnih raztopin z X-VIVO™ 15 se pripravijo s faktorjem redčenja 1,5, pri čemer se uporabi 96-jamični preskusni blok. Nato se 50 μ l/jamico razredčene raztopine doda 50 μ l suspenzije celic v jamicah na črni 96-jamični plošči z ravnim dnom. Vsako koncentracijo vsake preskusne kemikalije je treba preskusiti v 4 jamicah. Vzorci se nato zmešajo na stresalniku za plošče in 16 ur inkubirajo pri 37 °C in 5 % CO₂, nakar se izmeri luciferazna aktivnost, kot je opisano spodaj.
21. Kontrola s topilom je mešanica 50 μ l/jamico X-VIVO™ 15 in 50 μ l/jamico suspenzije celic v RPMI-1640, ki vsebuje 10 % FBS.
22. Priporočena pozitivna kontrola je 4-NBB. 20 mg 4-NBB se pripravi v 1,5-mililitrski mikrocentrifugirki, v katero se doda X-VIVO™ 15 do 1 ml. Epruveta se najmanj 30 minut energično meša in stresa na rotorju pri največji hitrosti 8 vrt/min. Po 5-minutnem centrifugiranju pri 20 000 g se supernatant razredči s faktorjem 4 z X-VIVO™ 15, 500 μ l razredčenega supernatanta pa se prenese v jamico na 96-jamičnem preskusnem bloku. Razredčeni supernatant se nadalje razredči z X-VIVO™ 15 s faktorjema 2 in 4, 50 μ l raztopine pa se doda 50 μ l suspenzije celic THP-G8 v jamicah na črni 96-jamični plošči z ravnim dnom (Dodatek 3.6). Vsako koncentracijo pozitivne kontrole je treba preskusiti v 4 jamicah. Plošča se stresa na stresalniku za plošče in 16 ur inkubira v CO₂-inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂), nakar se izmeri luciferazna aktivnost, kot je opisano v odstavku 29.
23. Priporočena negativna kontrola je LA. 20 mg LA se pripravi v 1,5-mililitrski mikrocentrifugirki, v katero se doda X-VIVO™ 15 do 1 ml (20 mg/ml). Raztopina z LA s koncentracijo 20 mg/ml se razredči s faktorjem 5 z X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 μ l te raztopine z LA s koncentracijo 4 mg/ml se prenese na 96-jamični preskusni blok. Ta raztopina se razredči s faktorjem 2 z X-VIVO™ 15 in nato znova s faktorjem 2, da se dobita raztopini 2 mg/ml in 1 mg/ml. 50 μ l teh treh raztopin in kontrola z vehiklom (X-VIVO™ 15) se doda 50 μ l suspenzije celic THP-G8 v jamicah na črni 96-jamični plošči z ravnim dnom. Vsako koncentracijo negativne kontrole je treba preskusiti v 4 jamicah. Plošča se stresa na stresalniku za plošče in 16 ur inkubira v CO₂-inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂), nakar se izmeri luciferazna aktivnost, kot je opisano v odstavku 29.
24. Uporabijo se lahko tudi druge primerne pozitivne ali negativne kontrole, če so na voljo podatki iz preteklih preskusov za izpeljavo primerljivih meril za sprejemljivost ponovitev.
25. Paziti je treba, da hlapne preskusne kemikalije ne izhlapijo in da ne pride do navzkrižne kontaminacije med jamicami s preskusnimi kemikalijami, npr. z zatesnitvijo plošče pred inkubacijo s preskusnimi kemikalijami.
26. Za preskusne kemikalije in kontrolo s topilom so potrebne od 2 do 4 ponovitve, da se izpelje pozitivna ali negativna napoved (glej preglednico 2). Vsaka ponovitev se izvede na drug dan s svežo osnovno raztopino preskusnih kemikalij z X-VIVO™ 15 in neodvisno odvzetimi celicami. Celice lahko sicer izhajajo iz iste pasaže.

Meritve luciferazne aktivnosti

27. Luminiscenca se meri z luminometrom za mikrotitrne plošče, opremljenim z optičnimi filtri, npr. Phelios (ATTO, Tokio, Japonska), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Nemčija) in serija ARVO (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, ZDA). Luminometer mora biti umerjen za vsak preskus, da se zagotovi obnovljivost (19). Za to umerjanje so na voljo rekombinantne luciferaze, ki oddajajo oranžno in rdečo svetlobo.
28. 100 µl predhodno segretega luciferaznega reagenta Tripluc® (Tripluc) se prenese v vsako jamico na plošči, ki vsebuje suspenzijo celic, tretirano s kemikalijo ali brez kemikalije. Plošča se stresa 10 minut pri sobni temperaturi približno 20 °C. Plošča se vstavi v luminometer, da se izmeri luciferazna aktivnost. Bioluminiscenca se meri po 3 sekunde v odsotnosti (F0) in prisotnosti (F1) optičnega filtra. Če se uporabijo drugačne nastavitve, npr. glede na uporabljeni model luminometra, jih je treba utemeljiti.
29. Parametri za vsako koncentracijo se izračunajo iz izmerjenih vrednosti, npr. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, srednji $\pm$ SD IL8LA, srednji $\pm$ SD GAPLA, srednji $\pm$ SD nIL8LA, srednji $\pm$ SD Ind-IL8LA, srednji $\pm$ SD Inh-GAPLA in 95-odstotni interval zaupanja za Ind-IL8LA. Opredelitve parametrov, uporabljenih v tem odstavku, so navedene v dodatkih 3.1 in 3.4.
30. Pred meritvijo se običajno doseže barvno razlikovanje v večbarvnih poročevalskih poskusih z uporabo detektorjev (luminometer in čitalec plošče), opremljenih z optičnimi filtri, kot so ozko pasovno omejeni (dolgovalovni ali kratkovalovni prepustni) filtri ali pasovnoprepustni filtri. V skladu z Dodatkom 3.2 je treba koeficiente prepustnosti filtrov umeriti za vsako signalno barvo bioluminiscence.

PODATKI IN POROČANJE

Ocenjevanje podatkov

31. V skladu z merili za pozitivno/negativno odločitev je treba v vsaki ponovitvi:
- napoved preskusa IL-8 Luc oceniti kot pozitivno, če ima preskusna kemikalija Ind-IL8LA $\geq 1,4$ in je spodnja meja 95-odstotnega intervala zaupanja Ind-IL8LA $\geq 1,0$;
 - napoved preskusa IL-8 Luc oceniti kot negativno, če ima preskusna kemikalija Ind-IL8LA $< 1,4$ in/ali je spodnja meja 95-odstotnega intervala zaupanja Ind-IL8LA $< 1,0$.

Napovedni model

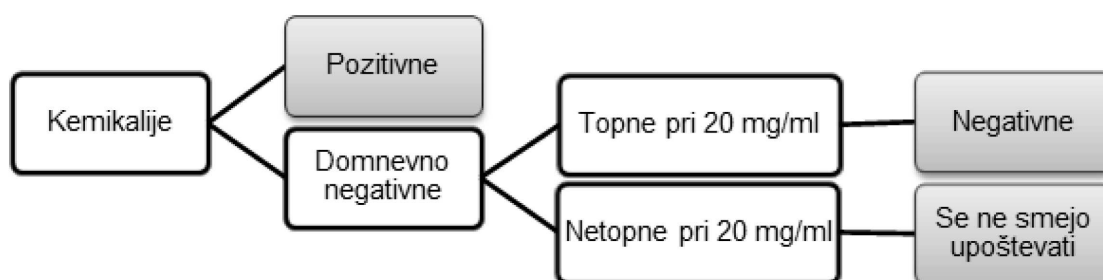
32. Preskusne kemikalije, ki dajo pri prvi, drugi, tretji ali četrti ponovitvi dva pozitivna rezultata, se opredelijo kot pozitivne, medtem ko se preskusne kemikalije, ki dajo pri prvi, drugi, tretji ali četrti ponovitvi tri negativne rezultate, opredelijo kot domnevno negativne (preglednica 2). Med domnevno negativnimi kemikalijami se kemikalije, ki se raztopijo pri 20 mg/ml X-VIVO™ 15, ocenijo kot negativne, medtem ko se kemikalije, ki se ne raztopijo pri 20 mg/ml X-VIVO™ 15, ne smejo upoštevati (slika 1).

Preglednica 2

Merila za opredelitev pozitivnih in domnevno negativnih kemikalij

1. ponovitev	2. ponovitev	3. ponovitev	4. ponovitev	Končna napoved
pozitivna	pozitivna	–	–	pozitivna
	negativna	pozitivna	–	pozitivna
		negativna	pozitivna	pozitivna
			negativna	domnevno negativna
negativna	pozitivna	pozitivna	–	pozitivna
		negativna	pozitivna	pozitivna
			negativna	domnevno negativna
	negativna	pozitivna	pozitivna	pozitivna
			negativna	domnevno negativna
		negativna	–	domnevno negativna

Slika 1

Napovedni model za končno oceno**Merila za sprejemljivost**

33. Pri uporabi preskusa IL-8 Luc morajo biti izpolnjena naslednja merila za sprejemljivost.

- Ind-IL8LA mora biti večji od 5,0 pri vsaj eni koncentraciji pozitivne kontrole, tj. 4-NBB, in to v vsaki ponovitvi.
- Ind-IL8LA mora biti manjši od 1,4 pri kateri koli koncentraciji negativne kontrole, tj. mlečne kisline, in to v vsaki ponovitvi.

- Podatke s plošč, za katere je GAPLA kontrolnih jamic s celicami in Triplucom, vendar brez kemikalij, manjši od 5-kratnika GAPLA jamice, ki vsebuje samo preskusno gojišče (50 µl/jamico RPMI-1640, ki vsebuje 10 % FBS, in 50 µl/jamico X-VIVO™ 15), je treba zavrniti.
- Podatke s plošč, za katere je Inh-GAPLA vseh koncentracij preskusnih ali kontrolnih kemikalij manjši od 0,05, je treba zavrniti. V takem primeru je treba prvi preskus ponoviti, tako da je najvišja končna koncentracija ponovljenega preskusa najnižja končna koncentracija prejšnjega preskusa.

Poročilo o preskusu

34. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusne kemikalije

Snov iz ene sestavine:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- fizični videz, topnost v vodi, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- topnost v X-VIVO™ 15. Za kemikalije, ki niso topne v X-VIVO™ 15, ali sta po centrifugiranju ugotovljena obarjanje ali flotacija;
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo, če X-VIVO™ 15 ni bil uporabljen.

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti, na primer s kemijsko identiteto (glej zgoraj), čistostjo, kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (glej zgoraj) sestavin, če so na voljo;

- fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo;
- molekulska masa ali navidezna molekulska masa v primeru zmesi/polimerov z znano sestavo ali drugi podatki, pomembni za izvedbo študije;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- topnost v X-VIVO™ 15. Za kemikalije, ki niso topne v X-VIVO™ 15, ali sta po centrifugiranju ugotovljena obarjanje ali flotacija;
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila/vehikla za vsako preskusno kemikalijo, če X-VIVO™ 15 ni bil uporabljen.

Kontrole

Pozitivna kontrola:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS, oznaka po sistemu SMILES ali identifikator InChI, strukturna formula in/ali drugi identifikatorji;
- fizični videz, topnost v vodi, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če so na voljo in če je ustrezno;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;
- obdelava pred preskušanjem, če je ustrezno (npr. segrevanje, mletje);
- preskušene koncentracije;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- sklicevanje na rezultate pozitivnih kontrol iz preteklih preskusov, ki kažejo ustrezna merila za sprejemljivost ponovitev, če je to ustrezno.

Negativna kontrola:

- kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po IUPAC ali CAS, številka CAS in/ali drugi identifikatorji;
- čistost, kemijska identiteta nečistot, kot je ustrezno in praktično izvedljivo, itd.;

- fizični videz, molekulska masa in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti, če se uporabijo druge negativne kontrole razen tistih, ki so navedene v smernici za preskušanje, in če so na voljo;
- pogoji shranjevanja in stabilnost, če so na voljo;
- utemeljitev izbire topila za vsako preskusno kemikalijo.

Preskusni pogoji:

- ime in naslov naročnika, preskuševalnega laboratorija in vodje študije;
- opis uporabljenega preskusa;
- uporabljena celična linija, pogoji njenega hranjenja in vir (npr. laboratorij, ki jo je zagotovil);
- številka serije in izvor FBS, ime dobavitelja, številka serije črne 96-jamične plošče z ravnim dnom ter številka serije reagenta Tripluc;
- število pasaž in gostota celic, uporabljenih za preskušanje;
- metoda štetja celic, uporabljena za nasaditev pred preskušanjem, in ukrepi, sprejeti za zagotovitev homogene porazdelitve števila celic;
- uporabljeni luminometer (npr. model), vključno z nastavitvami instrumenta, uporabljenim substratom luciferaze in prikazom ustreznih meritev luminiscence, ki temeljijo na kontrolnem preskusu, opisanem v Dodatku 3.2;
- postopek, uporabljen za dokazovanje usposobljenosti laboratorija v zvezi z izvedbo preskusa (npr. s preskušanjem snovi za preverjanje usposobljenosti) ali za prikaz ponovljivosti izvedbe preskusa v daljšem časovnem obdobju.

Preskusni postopek:

- število ponovljenih vzorcev in izvedenih ponovitev;
- uporabljene koncentracije preskusnih kemikalij, postopek dodajanja in čas izpostavljenosti (če so drugačni od priporočenih);
- opis uporabljenih meril za ocenjevanje in odločitev;
- opis uporabljenih meril za sprejemljivost študije;
- opis vseh prilagoditev preskusnega postopka.

Rezultati:

- meritve IL8LA in GAPLA;
- izračuni za nIL8LA, Ind-IL8LA in Inh-GAPLA;
- 95-odstotni interval zaupanja Ind-IL8LA;
- graf, ki prikazuje krivulje odziva na odmerek za indukcijo luciferazne aktivnosti in viabilnost;
- opis kakršnih koli drugih pomembnih opažanj, če je ustrezno.

Razprava o rezultatih:

- razprava o rezultatih, pridobljenih s preskusom IL-8 Luc;
- obravnavanje rezultatov preskusa v okviru IATA, če so na voljo druge pomembne informacije.

*Sklepna ugotovitev***VIRI**

- (1) Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Yamasaki, K., in Aiba, S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
- (2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment (št. 267), ENV/JM/MONO(2017)19. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment (št. 258), ENV/JM/MONO(2017)20. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment (št. 256), ENV/JM/MONO(2016)29. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- (5) van der Veen, J. W., Rorije, E., Emter, R., Natsch, A., van Loveren, H., in Ezendam, J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
- (6) Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., in Aiba, S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.
- (8) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., in Itagaki, H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 38:275-84.
- (9) Patlewicz, G., Casati, S., Basketter, D. A., Asturiol, D., Roberts, D. W., Lepoittevin, J.-P., Worth, A., in Aschberger, K. (2016). Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? *Regul Toxicol Pharmacol*, 82:147-155.
- (10) Thorne, N., Inglese, J., in Auld, D. S. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem Biol* 17:646-57.
- (11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Pariz. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani, V., Uchida, A., Suenaga, N., Ryufuku, M., in Ohmiya, Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1286-91.
- (13) Viviani, V. R., Bechara, E. J., in Ohmiya, Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38:8271-9.
- (14) Nakajima, Y., Kimura, T., Sugata, K., Enomoto, T., Asakawa, A., Kubota, H., Ikeda, M., in Ohmiya, Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques* 38:891-4.
- (15) OECD (2017). Še ni objavljeno – Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Pariz, Francija.

- (16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment (št. 34). OECD, Pariz, Francija.
- (17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz. Na voljo na: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECDFinal Draft GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECDFinal%20Draft%20GIVIMP.pdf).
- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, na voljo na: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa, K., Ichino, Y., Kumata, S., Nakajima, Y., Hiraishi, Y., Kato, D., Viviani, V. R., in Ohmiya, Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046-9.
- (20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 168). OECD, Pariz, Francija.
- (21) Združeni narodi (2015). Globalno usklajeni sistem za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS). Šesta revidirana izdaja. New York in Ženeva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Na voljo na: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Dodatek 3.1

OPREDELITVE POJMOV

Točnost: stopnja ujemanja rezultatov preskusa s sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Je merilo učinkovitosti preskusa in eden od vidikov ustreznosti. Ta izraz in izraz skladnost se pogosto uporabljata kot sopomenki in pomenita delež pravilnih rezultatov preskusa (16).

Potek neželenega izida (Adverse Outcome Pathway – AOP): zaporedje dogodkov od kemijske strukture ciljne kemikalije ali skupine podobnih kemikalij prek začetnega dogodka na molekulski ravni do preiskovanega rezultata *in vivo* (20).

Kemikalija: snov ali zmes.

CV05: viabilnost celic 05, tj. najmanjša koncentracija, pri kateri je Inh-GAPLA kemikalij manjša od 0,05.

FluSLO-LA: kratica, uporabljena v validacijskem poročilu in prejšnjih publikacijah v zvezi s preskusom IL-8 Luc za sklicevanje na Ind-IL8LA. Glej Ind-IL8LA za opredelitev pojma.

GAPLA: luciferazna aktivnost stabilne luciferaze rdeča (SLR) ($\lambda_{\text{maks.}} = 630 \text{ nm}$), ki jo regulira promotor GAPDH ter izkazuje viabilnost celic in število viabilnih celic.

Nevarnost: neločljiva lastnost sredstva ali stanje, ki lahko ob izpostavljenosti temu sredstvu povzroči neželen učinek na organizem, sistem ali (pod)populacijo.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment = celostni pristop k testiranju in ocenjevanju): strukturalen pristop, ki se uporablja za ugotavljanje nevarnosti (potencial), opredeljevanje nevarnosti (moč) in/ali oceno varnosti (potencial/moč in izpostavljenost) kemikalije ali skupine kemikalij ter strateško zajame in oceni vse pomembne podatke, da se lahko sprejme regulativna odločitev v zvezi z morebitno nevarnostjo in/ali tveganjem in/ali potrebo po nadaljnjem, ciljno usmerjenem in s tem minimalnem preskušanju.

II-SLR-LA: kratica, uporabljena v validacijskem poročilu in prejšnjih publikacijah v zvezi s preskusom IL-8 Luc za sklicevanje na Inh-GAPLA. Glej Inh-GAPLA za opredelitev pojma.

IL-8 (interlevkin-8): citokin, ki izhaja iz endotelijskih celic, fibroblastov, keratinocitov, makrofagov in monocitov ter povzroča kemotakso nevtrofilcev in limfocitov T.

IL8LA: luciferazna aktivnost stabilne luciferaze oranžna (SLO) ($\lambda_{\text{maks.}} = 580 \text{ nm}$), ki jo regulira promotor IL-8.

Ind-IL8LA: stopnja indukcije nIL8LA. Dobi se z delitvijo nIL8LA celic THP-G8, tretiranih s kemikalijami, z nIL8LA nestimuliranih celic THP-G8 in predstavlja indukcijo aktivnosti promotorja IL-8 s strani kemikalij.

Inh-GAPLA: inhibicija GAPLA. Dobi se z delitvijo GAPLA celic THP-G8, tretiranih s kemikalijami, z GAPLA netretiranih celic THP-G8 in predstavlja citotoksičnost kemikalij.

Najnižji prag indukcije (MIT): najnižja koncentracija, pri kateri kemikalija izpolnjuje pozitivna merila.

Zmes: zmes ali raztopina iz dveh ali več snovi.

Snov iz ene sestavine: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je vsaj 80 mas. % glavne sestavine.

Snov z več sestavinami: snov, ki jo opredeljuje njena kvantitativna sestava in v kateri je več glavnih sestavin s koncentracijo ≥ 10 mas. % in < 80 mas. %. Snov z več sestavinami je rezultat proizvodnega postopka. Razlika med zmesjo in snovjo z več sestavinami je v tem, da je zmes pridobljena z mešanjem dveh ali več snovi brez kemične reakcije. Snov z več sestavinami je rezultat kemične reakcije.

nIL8LA: aktivnost luciferaze SLO, ki izraža aktivnost promotorja IL-8 (IL8LA), normalizirana z aktivnostjo luciferaze SLR, ki izraža aktivnost promotorja GAPDH (GAPLA). Predstavlja aktivnost promotorja IL-8 po upoštevanju viabilnosti celic ali števila celic.

nSLO-LA: kratica, uporabljena v validacijskem poročilu in prejšnjih publikacijah v zvezi s preskusom IL-8 Luc za sklicevanje na nIL8LA. Glej nIL8LA za opredelitev pojma.

Pozitivna kontrola: ponovljen vzorec, ki vsebuje vse sestavine preskusnega sistema in se tretira s snovjo, za katero je znano, da povzroči pozitiven odziv. Za zagotovitev, da se lahko variabilnost odziva pozitivne kontrole oceni v daljšem časovnem obdobju, pa stopnja pozitivnega odziva ne sme biti previsoka.

Prehapteni: kemikalije, ki postanejo povzročitelji preobčutljivosti kože z abiotsko pretvorbo.

Prohapteni: kemikalije, ki potrebujejo encimsko aktivacijo, da bi uresničevale potencial za povzročanje preobčutljivosti kože.

Ustreznost: opis razmerja med preskusom in preiskovanim učinkom ter njegovega pomena in uporabnosti za določen namen. Pomeni stopnjo, do katere preskus pravilno izmeri ali napove preiskovani biološki učinek. Pri ustreznosti se upošteva tudi točnost (skladnost) preskusa (16).

Zanesljivost: stopnja obnovljivosti preskusa v enem ali več laboratorijih v daljšem časovnem obdobju ob uporabi istega protokola. Oceni se z izračunom obnovljivosti v enem ali več laboratorijih in interne laboratorijske ponovljivosti (16).

Ponovitev: ponovitev zajema eno ali več preskusnih kemikalij, preskušanih sočasno s kontrolo s topilom/vehiklom in pozitivno kontrolo.

Občutljivost: delež vseh pozitivnih/aktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (16).

SLO-LA: kratica, uporabljena v validacijskem poročilu in prejšnjih publikacijah v zvezi s preskusom IL-8 Luc za sklicevanje na IL8LA. Glej IL8LA za opredelitev pojma.

SLR-LA: kratica, uporabljena v validacijskem poročilu in prejšnjih publikacijah v zvezi s preskusom IL-8 Luc za sklicevanje na GAPLA. Glej GAPLA za opredelitev pojma.

Kontrola s topilom/vehiklom: netretiran vzorec, ki vsebuje vse komponente preskusnega sistema razen preskusne kemikalije, vključuje pa topilo/vehikel, ki se uporabi. Uporablja se za določanje izhodiščnega odziva za vzorce, tretirane s preskusno kemikalijo, raztopljeno ali stabilno dispergirano v istem topilu/vehiklu. Pri preskušanju s sočasno kontrolo z gojiščem ta vzorec tudi pokaže, ali topilo/vehikel reagira s preskusnim sistemom.

Specifičnost: delež vseh negativnih/neaktivnih kemikalij, ki se s preskusom pravilno razvrstijo. Je merilo točnosti za preskus, s katerim se pridobijo kategorični rezultati, in pomemben dejavnik pri ocenjevanju ustreznosti preskusa (16).

Snov: kemijski elementi in njihove spojine, ki so v naravnem stanju ali pridobljeni s katerim koli proizvodnim postopkom, vključno z vsemi dodatki, potrebnimi za ohranitev stabilnosti produkta, in kakršnimi koli nečistotami, ki so nastale v uporabljenem postopku, vendar brez kakršnega koli topila, ki ga je mogoče ločiti, ne da bi to vplivalo na stabilnost snovi ali spremenilo njeno sestavo.

Površinsko aktivna snov: snov, kot je detergent, ki lahko zmanjša površinsko napetost tekočine in tako omogoči, da se speni ali prodre v trdne snovi; znana je tudi kot omakalno sredstvo. (TG437)

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena z uporabo te metode.

THP-G8: reporterska celična linija IL-8, uporabljena v preskusu IL-8 Luc. Humana makrofagna celična linija THP-1 je bila transfecirana z luciferaznim genom SLO in SLR pod kontrolo promotorjev IL-8 oziroma GAPDH.

Globalno usklajeni sistem Združenih narodov za razvrščanje in označevanje kemikalij (GHS ZN): sistem za razvrščanje kemikalij (snovi in zmesi) v skladu s standardiziranimi vrstami in stopnjami fizičnih, zdravstvenih in okoljskih nevarnosti ter za obravnavanje ustreznega označevanja, na primer s piktogrami, opozorilnimi besedami, stavki o nevarnosti, previdnostnimi stavki in varnostnimi listi, da bi se razširile informacije o škodljivih učinkih kemikalij ter s tem zaščitili ljudi (vključno z delodajalci, delavci, prevozniki, potrošniki in reševalci) in okolje (21).

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

Veljavna preskusna metoda: preskus, ki se obravnava kot dovolj ustrezen in zanesljiv za določen namen ter temelji na znanstveno utemeljenih načelih. Preskus ni nikoli veljaven v absolutnem smislu, ampak samo v zvezi z opredeljenim namenom.

Dodatek 3.2

NAČELO MERITVE LUCIFERAZNE AKTIVNOSTI IN DOLOČITEV KOEFICIENTOV PREPUSTNOSTI OPTIČNEGA FILTRA ZA SLO IN SLR

MultiReporter Assay System – Tripluc se lahko uporabi z luminometrom za mikrotitrne plošče z večbarvnim sistemom zaznavanja, s katerim je lahko opremljen optični filter (npr. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Optični filter, ki se uporabi pri meritvi, je 600–620-nanometrski dolgovalovni ali kratkovalovni prepustni filter ali 600–700-nanometrski pasovnoprepustni filter.

Meritev dvobarvnih luciferaz z optičnim filtrom

To je primer uporabe filtra Phelios AB-2350 (ATTO). Ta luminometer je opremljen s 600-nanometrskim dolgovalovnim prepustnim filtrom (R60 HOYA Co., 600 nm LP, filter 1) za razdelitev luminiscence SLO ($\lambda_{\text{maks.}} = 580 \text{ nm}$) in SLR ($\lambda_{\text{maks.}} = 630 \text{ nm}$).

Za določitev koeficientov prepustnosti 600-nanometriškega LP se najprej z uporabo prečiščenih luciferaznih encimov SLO in SLR izmeri (i) intenziteta bioluminiscence SLO in SLR brez filtra (F0), (ii) intenziteta bioluminiscence SLO in SLR pri prehodu čez 600-nanometrski LP (filter 1) in (iii) izračunata koeficienta prepustnosti 600-nanometriškega LP za SLO in SLR, navedena spodaj.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	$=\kappa O_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Kadar je intenziteta SLO in SLR v preskusnem vzorcu opredeljena kot O oziroma R, se (i) intenziteta svetlobe brez filtra (vse optično) F0 in (ii) intenziteta svetlobe, ki prehaja skozi 600-nanometrski LP (filter 1) F1, opišeta, kot je navedeno spodaj.

$$F0 = O + R$$

$$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

Ti formuli je mogoče zapisati tudi tako:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Z uporabo izračunanih faktorjev prepustnosti (κO_{R60} in κR_{R60}) ter izmerjenih F0 in F1 se lahko nato vrednost O in R izračuna tako:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materiali in metode za določitev faktorja prepustnosti

(1) Reagenti

Enkratna prečiščena encima luciferaze:

liofilizirani prečiščeni encim SLO

liofilizirani prečiščeni encim SLR

(ki sta bila za validacijsko delo pridobljena od GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonska, s celično linijo THP-G8)

Preskusni reagent:

luciferazni reagent Tripluc® (na primer iz TOYOBO Cat#MRA-301)

Gojišče: za luciferazni preskus (30 ml, shranjeno pri od 2 do 8 °C)

Reagent	Konc.	Končna konc. v gojišču	Potrebna količina
RPMI-1640	–	–	27 ml
FBS	–	10 %	3 ml

(2) Priprava encimske raztopine

Lifolizirani prečiščeni encim luciferaze raztopite v epruveti, tako da dodate 200 µl 10~100 mM Tris/HCl ali Hepes/HCl (pH 7,5~8,0) z dodatkom 10 % (w/v) glicerola, encimsko raztopino razdelite na 10-mikrolitrne alikvotne v 1,5-mililitrski epruveti za enkratno uporabo ter jih shranite v zamrzovalniku pri –80 °C. Zamrznjena encimska raztopina je uporabna do 6 mesecev. Ob uporabi dodajte 1 ml gojišča za luciferazni preskus (RPMI-1640 z 10 % FBS) v vsako epruveto, v kateri je encimska raztopina (razredčena encimska raztopina), in jih hranite na hladnem, da preprečite deaktivacijo.

(3) Meritev bioluminiscence

Luciferazni reagent Tripluc® (Tripluc) odtajajte in ga hranite pri sobni temperaturi bodisi v vodni kopeli bodisi pri temperaturi zraka okolice. Luminometer vključite 30 minut pred začetkom meritve, da omogočite stabilizacijo fotopomnoževalnika. 100 µl razredčene encimske raztopine prenesite na črno 96-jamično ploščo (ravno dno) (referenčni vzorec SLO na #B1, #B2, #B3, referenčni vzorec SLR na #D1, #D2, #D3). Nato s pipetmanom prenesite 100 µl predhodno segretega reagenta Tripluc v vsako jamico na plošči, ki vsebuje razredčeno encimsko raztopino. Ploščo s stresalnikom plošč 10 minut stresajte pri sobni temperaturi (približno 25 °C). Iz raztopin v jamicah odstranite mehurčke, če se pojavijo. Ploščo vstavite v luminometer, da se izmeri luciferazna aktivnost. Bioluminiscenca se meri po 3 sekunde v odsotnosti (F0) in prisotnosti (F1) optičnega filtra.

Koeficient prepustnosti optičnega filtra je bil izračunan tako:

$$\text{koeficient prepustnosti (SLO } (\kappa O_{R60})) = (\#B1 \text{ F1} + \#B2 \text{ F1} + \#B3 \text{ F1}) / (\#B1 \text{ F0} + \#B2 \text{ F0} + \#B3 \text{ F0})$$

$$\text{koeficient prepustnosti (SLR } (\kappa R_{R60})) = (\#D1 \text{ F1} + \#D2 \text{ F1} + \#D3 \text{ F1}) / (\#D1 \text{ F0} + \#D2 \text{ F0} + \#D3 \text{ F0})$$

Izračunani faktorji prepustnosti se uporabijo za vse meritve, izvedene z istim luminometrom.

Nadzor nad kakovostjo opreme

Uporabiti je treba postopke, opisane v protokolu IL-8 Luc (18).

Dodatek 3.3

SNOVI ZA PREVERJANJE USPOSOBLJENOSTI

Pred redno uporabo preskusa, opisanega v tem dodatku k preskusni metodi B.71, morajo laboratoriji dokazati tehnično usposobljenost tako, da pridobijo napovedi preskusa IL-8 Luc, pričakovane za 9 snovi, ki so priporočene v preglednici 1, ter vrednosti, ki so za vsaj 8 od 9 snovi za preverjanje usposobljenosti (izbranih za predstavljanje območja odzivov za nevarnosti za preobčutljivost kože) v ustreznem referenčnem območju. Druga merila za izbiro so bila razpoložljivost snovi na trgu, razpoložljivost visokokakovostnih referenčnih podatkov *in vivo* in razpoložljivost visokokakovostnih podatkov *in vitro*, pridobljenih s preskusom IL-8 Luc. Za preskus IL-8 Luc so na voljo tudi objavljeni referenčni podatki (6) (1).

Preglednica 1:

Priporočene snovi za dokazovanje tehnične usposobljenosti za poskus IL-8 Luc

Snovi za preverjanje usposobljenosti	Št. CAS	Stanje	Topnost v X-VIVO15 pri 20 mg/ml	Napoved <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	Napoved IL-8 Luc ⁽²⁾	Referenčno območje (µg/ml) ⁽³⁾	
						CV ₀₅ ⁽⁴⁾	MIT IL-8 Luc ⁽⁵⁾
2,4-dinitroklorobenzen	97-00-7	trdna snov	netopen	povzročitelj preobčutljivosti (izjemno močen)	pozitivna	2,3–3,9	0,5–2,3
formaldehid	50-00-0	tekočina	topen	povzročitelj preobčutljivosti (močen)	pozitivna	9–30	4–9
2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	trdna snov	netopen	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	pozitivna	250–290	60–250
etilendiamin	107-15-3	tekočina	topen	povzročitelj preobčutljivosti (zmeren)	pozitivna	500–700	0,1–0,4
etilenglikol dimetakrilat	97-90-5	tekočina	netopen	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	pozitivna	> 2000	0,04–0,1
4-alilanzol (estragol)	140-67-0	tekočina	netopen	povzročitelj preobčutljivosti (šibek)	pozitivna	> 2000	0,01–0,0-7
streptomycin sulfat	3810-74-0	trdna snov	topen	ne povzroča preobčutljivosti	negativna	> 2000	> 2000
glicerol	56-81-5	tekočina	topen	ne povzroča preobčutljivosti	negativna	> 2000	> 2000
izopropanol	67-63-0	tekočina	topen	ne povzroča preobčutljivosti	negativna	> 2000	> 2000

Kratice: št. CAS = registrska številka Službe za izmenjavo kemijskih izvlečkov.

⁽¹⁾ Moč *in vivo* se izpelje s pomočjo meril, ki jih je predlagal ECETOC (19).

⁽²⁾ Na podlagi ugotovljenih vrednosti iz preteklih preskusov (1) (6).

⁽³⁾ CV₀₅ in MIT IL-8 Luc sta bila izračunana z uporabo topnosti v vodi, pridobljeno z EPI Suite™.

⁽⁴⁾ CV₀₅: najnižja koncentracija, pri kateri je Inh-GAPLA kemikalij manjša od 0,05.

⁽⁵⁾ MIT: najnižje koncentracije, pri katerih kemikalija izpolnjuje pozitivna merila.

Dodatek 3.4

INDEKSI IN MERILA ZA PRESOJO

nIL8LA (nSLO-LA)

J-ta ponovitev ($j = 1-4$) i-te koncentracije ($i = 0-11$) se izmeri za IL8LA (SLO-LA) oziroma GAPLA (SLR-LA). Normalizirana IL8LA, navedena kot nIL8LA (nSLO-LA), je opredeljena kot:

To je osnovna merska enota v tem preskusu.

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Ind-IL8LA (FlnSLO-LA)

Primarno merilo tega preskusa je stopnja povečanja povprečne nIL8LA (nSLO-LA) za ponovitev pri i-ti koncentraciji v primerjavi z njo pri koncentraciji 0, tj. Ind-IL8LA. To razmerje je zapisano z naslednjo formulo:

$$\text{Ind-IL8LA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j} \right\}$$

Vodilni laboratorij je predlagal, naj vrednost 1,4 ustreza pozitivnemu rezultatu za preskusno kemikalijo. Ta vrednost temelji na preiskavi preteklih podatkov vodilnega laboratorija. Ekipa za upravljanje podatkov je nato to vrednost uporabila v vseh fazah validacijske študije. Glavni rezultat, Ind-IL8LA, je razmerje dveh aritmetičnih sredin, kot je prikazano v enačbi.

95-odstotni interval zaupanja (95 % CI)

Za 95-odstotni interval zaupanja (95 % CI), ki temelji na razmerju, se lahko šteje, da prikazuje natančnost tega primarnega merila izida. Spodnja meja 95 % CI ≥ 1 kaže, da je nIL8LA pri i-ti koncentraciji bistveno večja kot pri kontroli s topilom. 95 % CI je mogoče oblikovati na več načinov. V tej študiji smo uporabili metodo, znano kot Fiellerjev teorem. Ta teorem 95-odstotnega intervala zaupanja izhaja iz naslednje formule:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

pri čemer je:

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$$

$$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2$$

$$n_{yi} = 4$$

$$\bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$$

$$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2$$

$t_{0.975(v)}$ 97,5 percentila osrednje t-porazdelitve z v stopnjo svobode, pri čemer je

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA je razmerje med povprečno GAPLA (SLR-LA) za ponovitev pri i -ti koncentraciji in povprečno GAPLA pri kontroli s topilom, ki se zapiše tako:

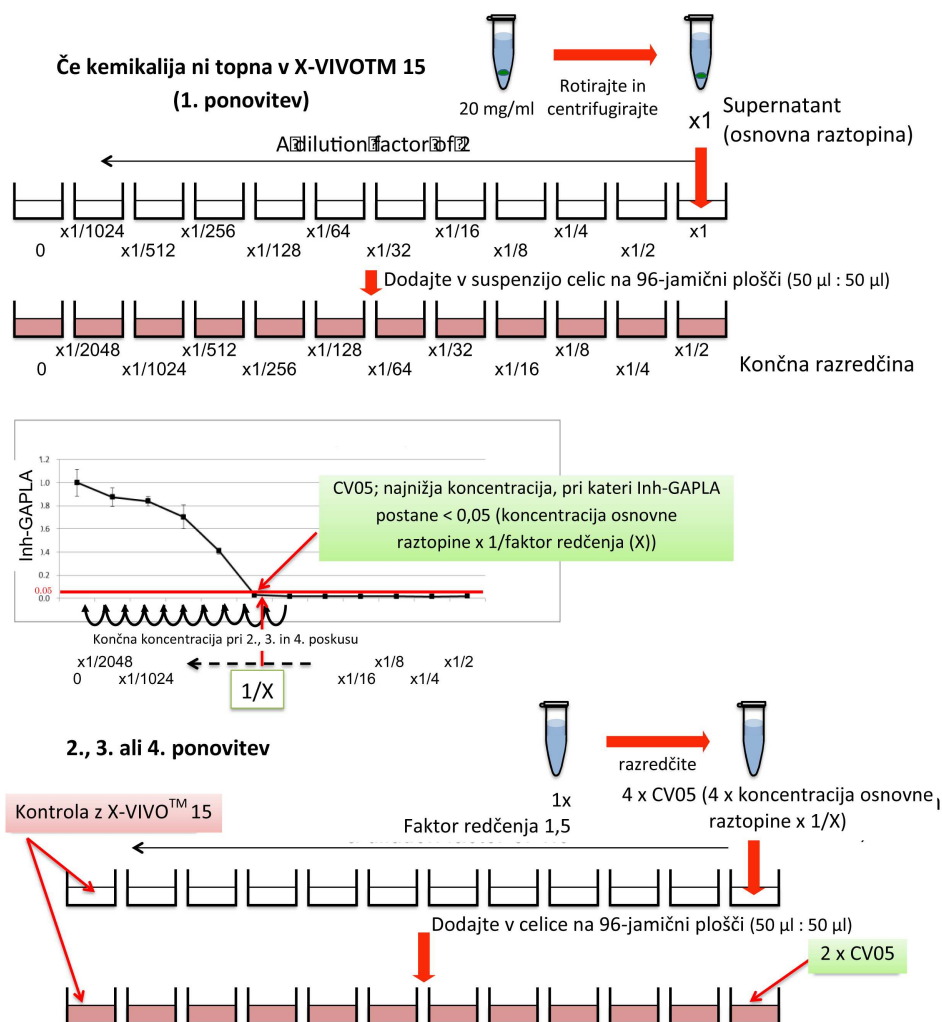
$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

Ker je GAPLA imenovalec nIL8LA, zelo majhna vrednost povzroči veliko spremembo v nIL8LA. Zato se lahko vrednosti Ind-IL8LA z zelo majhno vrednostjo Inh-GAPLA (manj kot 0,05) štejejo za nenatančne.

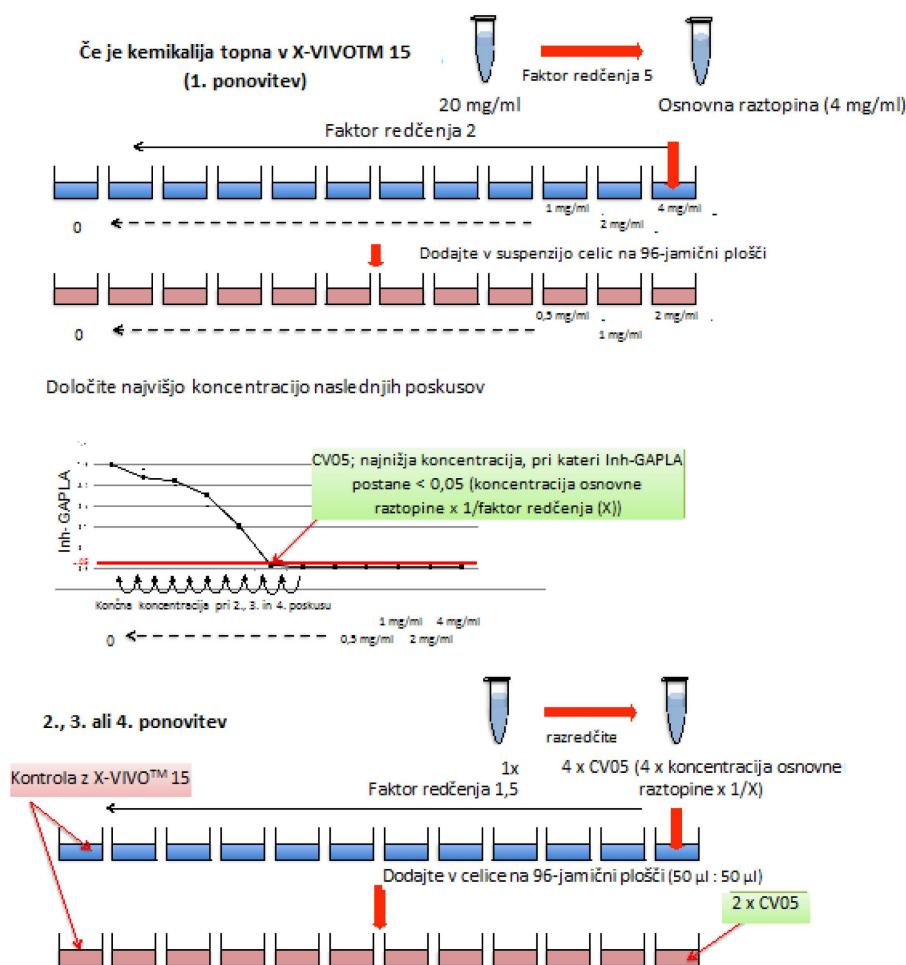
Dodatek 3.5

SHEMA METOD ZA RAZTOPITEV KEMIKAJIJ ZA PRESKUS IL-8 LUC

(a) Za kemikalije, raztopljene v X-VIVO™ 15 pri 20 mg/ml



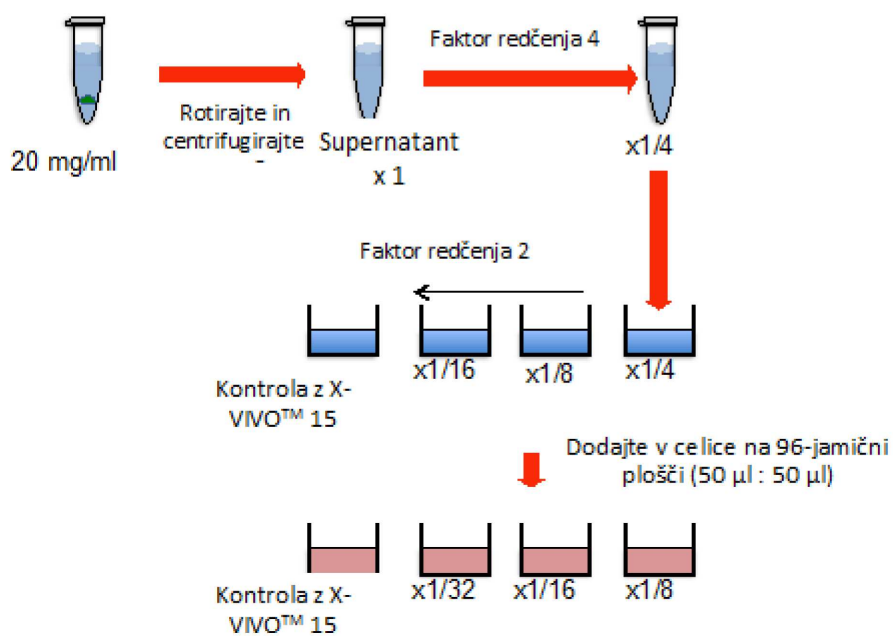
(b) Za kemikalije, ki niso topne v X-VIVO™ 15 pri 20 mg/ml



Dodatek 3.6

SHEMA METODE ZA RAZTOPITEV 4-NBB ZA POZITIVNO KONTROLO PRESKUSA IL-8 LUC

Pozitivna kontrola: 4-NBB (netopen v X-VIVO™ 15)



(9) V delu C se dodata naslednji poglavji:

„C.52 RAZŠIRJENI ENOGENERACIJSKI PRESKUS RAZMNOŽEVANJA MEDAKE (MEOGRT)

UVOD

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje (TG) 240 (2015). Razširjeni enogeneracijski preskus razmnoževanja medake (Medaka Extended One Generation Test, MEOGRT) opisuje izčrpno preskusno metodo, temelječo na ribah, izpostavljenih v več generacijah, za pridobitev podatkov, pomembnih za ekološko nevarnost in oceno tveganja kemikalij, vključno z domnevnimi endokrinimi motilci (endocrine disrupting chemicals, EDC). Izpostavljenost pri preskusu MEOGRT traja do izvalitve (do dveh tednov po oploditvi, tpo) v drugi generaciji (F2). Za utemeljitev koristnosti razširitve generacije F2 na čas po izvalitvi bi bile potrebne dodatne raziskave; trenutno pa ni dovolj informacij za zagotovitev ustreznih pogojev ali meril za utemeljitev razširitve generacije F2. Ta preskusna metoda bo sicer lahko posodobljena, ko se bodo upoštevale nove informacije in podatki. Na primer smernice o razširitvi generacije F2, tako da bi bilo vključeno razmnoževanje, bodo lahko koristne v nekaterih okoliščinah (npr. pri kemikalijah z velikim biokoncentracijskim potencialom ali znaki čezgeneracijskih učinkov pri drugih taksonih). Ta preskusna metoda se lahko uporabi za oceno morebitnih kroničnih učinkov kemikalij, vključno s potencialnimi endokrinimi motilci, na ribe. Glavni poudarek te metode je na morebitnih učinkih, pomembnih za populacijo (tj. škodljivih učinkih na preživetje, razvoj, rast in razmnoževanje), za izračun koncentracije brez opaznega učinka (NOEC) ali učinkovite koncentracije (ECx), čeprav je treba navesti, da so pristopi z ECx redko primerni za tovrstne velike študije, pri katerih bo morda povečanje števila preskusnih koncentracij, da bi se omogočila določitev želene ECx, neizvedljivo in lahko tudi povzroči precejšnje pomisleke glede dobrobiti živali zaradi velikega števila uporabljenih živalih. Za kemikalije, pri katerih ni potrebna ocena v več generacijah, ali kemikalije, ki niso potencialni endokrini motilci, bodo morda ustrežnejše druge preskusne metode (1). Ustrezna vrsta za uporabo v tej preskusni metodi je japonska medaka zaradi kratkega življenjskega cikla in možnosti določitve njenega genetskega spola (2), ki se v tej preskusni metodi šteje za kritično komponento. Posebne metode in opazovane končne točke, ki so podrobno navedene pri tej metodi, se uporabljajo samo za japonsko medako. Podobnemu preskusnemu protokolu se lahko prilagodijo druge vrste majhnih rib (npr. cebrica).
2. S to preskusno metodo se meri več bioloških končnih točk. Prvotni poudarek je na morebitnih škodljivih učinkih na parametre, pomembne za populacijo, ki vključujejo preživetje, razvoj, rast in razmnoževanje. Drugič, da se zagotovijo mehanistični podatki in povezava z rezultati iz drugih vrst terenskih in laboratorijskih študij, kadar obstajajo naknadni dokazi, da je kemikalija potencialni endokrini motilec (npr. androgeno ali estrogeno delovanje iz drugih preskusov in poskusov), se druge koristne informacije pridobijo z merjenjem mRNK *vitelogenina* (*vtg*) (ali proteina vitelogenin, VTG), fenotipskih sekundarnih spolnih značilnosti (SSZ), kot so povezane z genetskim spolom, in histopatološko oceno. Opozoriti je treba, da če za preskusno kemikalijo ali njene metabolite ne obstaja sum, da so EDC, morda ne bo treba izmeriti teh sekundarnih končnih točk, zato bodo morda primernejše študije, za katere bo potrebnih manj virov in manj živali (1). Pojmi, uporabljeni v tej preskusni metodi, so opredeljeni v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

3. Zaradi omejenega števila preskušanih kemikalij in laboratorijev, vključenih v validacijo tega razmeroma kompleksnega preskusa, se predvideva, da bo preskusna metoda pregledana in po potrebi spremenjena glede na pridobljene izkušnje, ko bo na voljo zadostno število študij za potrditev učinka tega novega koncepta študije. Podatki se lahko uporabijo na ravni 5 temeljnega okvira OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev (OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors) (3). Preskusna metoda se začne z izpostavitvijo odraslih rib (generacija F0) preskusni kemikaliji v fazi razmnoževanja. Izpostavljenost se nadaljuje med razvojem in razmnoževanjem v generaciji F1 in izvalitvijo v generaciji F2; preskus tako omogoča oceno strukturnih in aktivacijskih endokrinih poti. Pri razlagi končnih točk, povezanih z endokrinim sistemom, se lahko uporabi pristop, ki temelji na zanesljivosti dokazov.
4. V preskus mora biti vključeno zadostno število osebkov, da se zagotovi zadostna moč za oceno končnih točk, pomembnih za razmnoževanje (glej Dodatek 3), obenem pa je treba poskrbeti, da je zaradi dobrobiti živali uporabljeno najmanjše potrebno število živali. Glede na veliko število uporabljenih preskusnih živali je pomembno, da se skrbno presodi potreba po preskusu glede na obstoječe podatke, ki že lahko vsebujejo ustrezne informacije o številnih končnih točkah preskusa MEOGRT. Določeno pomoč v zvezi s tem je mogoče najti v okviru OECD za preskušanje toksičnosti za ribe (OECD Fish Toxicity Testing Framework) (1).

5. Preskusna metoda je bila oblikovana predvsem za prepoznavanje učinkov posamezne snovi. Če pa je potreben preskus zmesi, je treba preučiti, ali bo zagotovil sprejemljive rezultate za predvideni regulativni namen.
6. Pred začetkom preskusa je pomembno imeti informacije o fizikalno-kemijskih lastnostih preskusne kemikalije, zlasti da se omogoči priprava stabilnih raztopin kemikalije. Prav tako je treba imeti ustrezno občutljivo analitsko metodo za preverjanje koncentracij preskusne kemikalije.

NAČELO PRESKUSA

7. Preskus se začne s tritedensko izpostavitvijo spolno zrelih samcev in samic (najmanj 12 tpo) v parih za razmnoževanje, med katero se preskusna kemikalija vnaša v organizem starševske generacije (F0) glede na njeno toksikokinetično obnašanje. Čim bližje prvemu dne četrtga tedna se odvzamejo iker, da se začne generacija F1. Med vzrejo generacije F1 (skupaj 15 tednov) se ocenita valilnost in preživetje. Poleg tega se odvzame vzorec rib pri 9. do 10. tpo za razvojne končne točke, drstenje pa se ocenjuje tri tedne od 12. do 14. tpo. Generacija F2 se začne po tretjem tednu od ocene razmnoževanja in vzreja do konca izvalitve.

MERILA ZA VELJAVNOST PRESKUSA

8. Uporabljajo se naslednja merila za veljavnost preskusa:
 - koncentracija raztopljenega kisika mora biti med celotnim preskusom ≥ 60 % nasičenosti z zrakom;
 - srednja temperatura vode mora biti med celotnim trajanjem študije med 24 in 26 °C. Kratkotrajna odstopanja od srednje vrednosti v posameznih akvarijih ne smejo presegati 2 °C;
 - srednja plodnost kontrol v vsaki generaciji (F0 in F1) mora biti večja od 20 iker na par na dan. Fertilitnost vseh iker, odloženih med oceno, mora biti več kot 80-odstotna. Poleg tega mora 16 od priporočenih 24 kontrolnih parov za razmnoževanje (> 65 %) proizvesti več kot 20 iker na par na dan;
 - valilnost iker mora biti ≥ 80 % (povprečno) v kontrolah (v vsaki od generacij F1 in F2);
 - preživetje po izvalitvi do 3 tpo in od 3 tpo do konca za generacijo F1 (tj. 15 tpo) mora biti ≥ 80 -odstotno (povprečno) oziroma ≥ 90 -odstotno (povprečno) v kontrolah (F1);
 - na voljo morajo biti dokazi, da so se koncentracije preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževale v okviru ± 20 % srednjih izmerjenih vrednosti.

Kar zadeva temperaturo vode, čeprav to ni merilo za veljavnost, se ponovljeni vzorci v okviru tretiranja ne smejo statistično razlikovati drug od drugega in tretirane skupine v okviru preskusa se ne smejo statistično razlikovati druga od druge (na podlagi dnevnih meritev temperature in brez kratkotrajnih odstopanj).

9. Čeprav se lahko v bolj izpostavljenih skupinah ugotovi zmanjšano razmnoževanje, je potrebno zadostno razmnoževanje v vsaj tretji najbolj izpostavljeni skupini in vseh manj izpostavljenih skupinah generacije F0, da se zapolnijo valilniki. Poleg tega je potrebno zadostno preživetje zarodkov v tretji najbolj izpostavljeni skupini in manj izpostavljenih skupinah v generaciji F1, da se omogoči ocena končnih točk pri vzorčenju mladostnih osebkov (glej odstavka 36 in 38 ter Dodatek 9). Poleg tega je potrebno vsaj minimalno preživetje po izvalitvi (~ 20 -odstotno) v drugi najbolj izpostavljeni skupini generacije F1. To niso merila veljavnosti kot taka, ampak priporočila, da se omogoči izračun približnih NOEC.

10. Če je ugotovljeno odstopanje od meril za veljavnost preskusa, je treba posledice obravnavati glede na zanesljivost rezultatov preskusa ter ta odstopanja in razmisleke vključiti v poročilo o preskusu.

OPIS METODE

Oprema

11. Običajna laboratorijska oprema in zlasti naslednje:

- (a) oksimetri in merilniki pH;
- (b) oprema za določanje trdote in alkalnosti vode;
- (c) ustrezne naprave za nadzor temperature in, po možnosti, stalno spremljanje;
- (d) akvariji iz kemijsko inertnih materialov in primerne prostornine glede na priporočeno obremenitev in gostoto rib (glej Dodatek 3);
- (e) ustrezno natančna tehtnica (tj. natančna na 0,5 mg).

Voda

12. Za preskusno vodo se lahko uporabi katera koli voda, v kateri preskusna vrsta kaže primerno dolgotrajno preživetje in rast. Kakovost vode mora biti ves čas trajanja preskusa konstantna. Za zagotovitev, da voda za redčenje ne bi neprimerno vplivala na rezultat preskusa (na primer s kompleksacijo preskusne kemikalije) ali škodljivo učinkovala na produktivnost plemenskih rib, je treba v časovnih razmikih jemati vzorce za analizo. Meritve težkih kovin (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih anionov in kationov (npr. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pesticidov, skupnega organskega ogljika in suspendiranih trdnih snovi je treba izvesti na primer vsakih šest mesecev, kadar se ve, da je kakovost vode za redčenje relativno konstantna. Nekatere kemijske značilnosti sprejemljive vode za redčenje so navedene v Dodatku 2. Vrednost pH vode mora biti med 6,5 in 8,5, znotraj enega preskusa pa mora biti v območju $\pm 0,5$ pH enote.

Sistem izpostavljenosti

13. Koncept in materiali, uporabljeni za sistem izpostavljenosti, niso določeni. Za postavitev preskusnega sistema je treba uporabiti steklo, nerjavno jeklo ali druge kemijsko inertne materiale, ki med predhodnimi preskusi niso bili kontaminirani. Za namen tega preskusa lahko primeren sistem izpostavljenosti zajema kontinuiran pretočni sistem (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Preskusne raztopine

14. Osnovno raztopino preskusne kemikalije je treba v sistem izpostavljenosti dovajati z ustrezno črpalko. Pretok osnovne raztopine je treba pred začetkom izpostavljenosti umeriti v skladu z analitsko potrditvijo preskusnih raztopin in ga med preskusom redno volumetrično preverjati. Preskusna raztopina v vsaki komori se ustrezno obnavlja (npr. najmanj 5 izmenjav količine/dan do 16 izmenjav količine/dan ali pretok 20 ml/min), odvisno od stabilnosti preskusne kemikalije in kakovosti vode.

15. Preskusne raztopine izbranih koncentracij se pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Osnovno raztopino je treba po možnosti pripraviti preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v vodi za redčenje z uporabo mehanskih sredstev (npr. z mešanjem in/ali ultrazvokom). Za pridobitev primerno koncentrirane osnovne raztopine se lahko uporabijo saturacijske kolone/sistemi ali metode pasivnega odmerjanja (14). Čim bolj si je treba prizadevati za neuporabo topil ali nosilcev, ker: (1) lahko nekatera topila povzročijo toksičnost in/ali neželene ali nepričakovane odzive, (2) lahko preskušanje kemikalij nad njihovo vodotopnostjo (kar se lahko pogosto zgodi pri uporabi topil) privede do netočnih določitev učinkovitih koncentracij, (3) lahko uporaba topil v dolgotrajnejših preskusih privede do znatne stopnje razvoja biofilma, povezanega z mikrobnó dejavnostjo, kar lahko vpliva na okoljske pogoje in zmožnost vzdrževanja koncentracij izpostavljenosti, ter (4) ob neobstoju preteklih podatkov, ki kažejo, da topilo ne vpliva na rezultat študije, uporaba topil zahteva kontrolno tretiranje s topilom, kar ima posledice za dobrobit živali, saj so za izvedbo preskusa potrebne dodatne živali. Za kemikalije, ki jih je težko preskusiti, se lahko kot zadnja rešitev uporabi topilo, pri čemer je treba za določitev najboljše metode upoštevati Smernico OECD št. 23 za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi v vodnem okolju (15). Topilo se izbere na podlagi kemijskih lastnosti preskusne kemikalije in razpoložljivosti preteklih podatkov o uporabi topila. Če se uporabijo topila kot nosilci, je treba poleg (negativnih) kontrol brez topila (samo voda za redčenje) oceniti ustrezne kontrole s topilom. Če se uporabi topila ni mogoče izogniti in se pojavi mikrobnó dejavnost (razvoj biofilma), se med celotnim preskusom priporoča evidentiranje/sporočanje razvoja biofilma po akvarijih (vsaj tedensko). V idealnih razmerah bi morala biti koncentracija topila konstantna v kontroli s topilom in vseh preskusnih tretiranjih. Če koncentracija topila ni konstantna, je treba v kontroli s topilom uporabiti najvišjo koncentracijo topila v preskusnem tretiranju. Kadar se uporabi topilo kot nosilec, najvišje koncentracije topila ne smejo presežati 100 µl/l ali 100 mg/l (15), priporočljivo pa je tudi, da koncentracija topila ostane čim nižja (npr. < 20 µl/l), da bi se izognili morebitnemu učinku topila na izmerjene končne točke (16).

Preskusne živali

Izbira in vzdrževanje rib

16. Preskusna vrsta je japonska medaka *Oryzias latipes*, in sicer zaradi kratkega življenjskega cikla in možnosti določitve genetskega spola. Čeprav se lahko podobnemu preskusnemu protokolu prilagodijo druge vrste majhnih rib, se posebne metode in opazovane končne točke, ki so podrobno predstavljene pri tej preskusni metodi, uporabljajo samo za japonsko medako (glej odstavek 1). Medaka je že pripravljena za razmnoževanje v ujetništvu; objavljene so metode za njeno gojenje (17) (18) (19), poleg tega so na voljo podatki iz preskusov v zvezi s kratkoročno smrtnostjo, zgodnjo življenjsko fazo in celotnim življenjskim ciklom (5) (6) (8) (9) (20). Za vse ribe velja svetlobni cikel, v katerem svetloba traja 16 ur, tema pa 8 ur. Ribe se hranijo z živimi navpliji solinskih rakcev vrste *Artemia*, ki se lahko po potrebi dopolnijo s hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu. Hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu, je treba redno analizirati glede prisotnosti onesnaževal.
17. Če se upoštevajo ustrezne ribogojске prakse, poseben protokol gojenja ni potreben. Medake se lahko na primer gojijo v dvolitrskih akvarijih z 240 larvalnimi ribami na akvarij do 4. tpo, nato se lahko gojijo v dvolitrskih akvarijih z 10 ribami na akvarij do 8. tpo, nato pa se v parih za razmnoževanje prenesejo v dvolitrske akvarije.

Aklimatizacija in izbira rib

18. Preskusne ribe je treba izbrati iz enega samega laboratorijskega staleža, ki se je vsaj dva tedna pred preskusom aklimatiziral v podobnih pogojih kakovosti vode in osvetljenosti, kot so tisti, ki se uporabijo v preskusu (opomba: to obdobje aklimatizacije ni *in situ* obdobje pred izpostavljenostjo). Priporočljivo je, da se preskusne ribe odvzamejo iz internega gojišča, saj je prestavljanje odraslih rib stresno in lahko vpliva na zanesljivo drstenje. Ribe je treba v celotnem obdobju vzdrževanja in med fazo izpostavljenosti hraniti dvakrat na dan z navpliji solinskih rakcev, ki se po potrebi dopolnijo s hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu. Za začetek tega preskusa in zagotovitev ustreznega števila ponovitev je potrebnih najmanj 42 parov za razmnoževanje (54 parov za razmnoževanje, če je potrebna kontrola s topilom, delno zaradi nepopolnih preteklih podatkov za podporo uporabi samo kontrole brez topila). Poleg tega je treba za vsak par za razmnoževanje iz generacije F0 preveriti, da je XX-XY (tj. običajni par spolnih kromosomov pri vsakem spolu), da se prepreči morebitna vključitev spontanah XX-samcev (glej odstavek 39).
19. Med fazo aklimatizacije je treba evidentirati pogine pri gojenih ribah in po 48-urnem obdobju prilagajanja uporabiti naslednja merila:

— več kot 10-odstotna smrtnost gojene populacije v sedmih dneh pred prenosom v preskusni sistem: celotna serija se zavrne;

- od 5- do 10-odstotna smrtnost populacije v sedmih dneh pred prenosom v preskusni sistem: dvotedensko obdobje aklimatizacije se podaljša za dodatnih sedem dni; če je v teh dodatnih sedmih dneh smrtnost večja od 5 %, se celotna serija zavrne;
- manj kot 5-odstotna smrtnost populacije v sedmih dneh pred prenosom v preskusni sistem: serija se sprejme.

20. Ribe se v dvotedenskem obdobju aklimatizacije pred preskusom in v obdobju izpostavljenosti ne smejo zdraviti zaradi bolezni, zdravljenju bolezni pa se je treba po možnosti popolnoma izogniti. V študiji se ne smejo uporabiti ribe s kliničnimi znaki bolezni. Voditi je treba evidenco opazanj in kakršnih koli profilaktičnih ali terapevtskih zdravljenj bolezni v obdobju gojenja pred preskusom.
21. Fazo izpostavljenosti je treba začeti s spolno dimorfnimi odraslimi ribami z določenim genetskim spolom iz laboratorijske zaloge razmnoževalno zrelih živali, gojenih pri 25 ± 2 °C. Ribe morajo biti v tednu pred izpostavljenostjo opredeljene kot dokazane plemenske ribe (tj. so že proizvedle viabilne potomce). Za celotno skupino rib, uporabljenih v preskusu, je treba teže posameznih rib po spolu na začetku preskusa vzdrževati v območju ± 20 % aritmetične sredine teže istega spola. Pred preskusom je treba stehitati podvzorec rib, da se oceni srednja teža. Izbrane ribe morajo biti najmanj 12 tpo, samice morajo tehtati ≥ 300 mg, samci pa ≥ 250 mg.

NAČRT PRESKUSA

Preskusne koncentracije

22. Priporoča se uporaba petih koncentracij kemikalije in kontrol. Pri izbiri območja preskusnih koncentracij je treba upoštevati vse vire informacij, vključno s kvantitativnimi razmerji med strukturo in aktivnostjo (QSAR), navzkrižnim branjem iz podobnih preskusov, rezultati preskusov pri ribah, kot so preskusi akutne toksičnosti (poglavje C.1 te priloge), kratkotrajni preskus razmnoževanja rib (poglavje C.48 te priloge) in druge preskusne metode, npr. poglavja C.15, C.37, C.41, C.47 ali C.49 te priloge (21) (22) (23) (24) (25) (26), če so na voljo, ali po potrebi iz preskusa za določanje območja, ki po možnosti vključuje fazo razmnoževanja. Preskus za določanje območja se po potrebi lahko izvede pod podobnimi pogoji (kakovost vode, preskusni sistem, število živali), kot se uporabijo za končni preskus. Če je treba uporabiti topilo in pretekli podatki niso na voljo, se lahko za opredelitev primernosti topila uporabi preskus za določanje območja. Najvišja preskusna koncentracija ne sme preseči topnosti v vodi, 10 mg/l ali 1/10 96h-LC50 (27). Najnižja koncentracija mora biti za 10- do 100-krat nižja od najvišje koncentracije. Uporaba petih koncentracij v tem preskusu omogoča ne samo meritev razmerja med odmerkom in odzivom, ampak zagotavlja tudi najnižjo koncentracijo z opaženim učinkom (LOEC) in NOEC, ki sta potrebni za oceno tveganja v nekaterih regulativnih programih ali jurisdikcijah. Na splošno je faktor razmika med nominalnimi koncentracijami preskusne kemikalije med sosednjimi stopnjami tretiranja $\leq 3,2$.

Ponovljeni vzorci v okviru tretiranih skupin in kontrol

23. Uporabiti je treba najmanj šest ponovitvenih preskusnih komor na preskusno koncentracijo (glej Dodatek 7). Med fazo razmnoževanja (razen generacije F0) se ponovitvena struktura podvoji za oceno plodnosti, vsak ponovljeni vzorec pa ima samo en par za razmnoževanje (glej odstavek 42).
24. Poleg preskusnih koncentracij je treba izvesti tudi kontrolo z vodo za redčenje in po potrebi kontrolo s topilom. Uporabiti je treba podvojeno število ponovitvenih komor za kontrole, da se zagotovi ustrezna statistična moč (tj. za kontrole je treba uporabiti vsaj 12 ponovljenih vzorcev). V fazi razmnoževanja se število ponovljenih vzorcev v kontrolah podvoji (tj. najmanj 24 ponovljenih vzorcev, vsak ponovljeni vzorec ima samo en paritveni par). Po razmnoževanju lahko kontrolni ponovljeni vzorci vsebujejo največ 20 zarodkov (rib).

POSTOPEK

Začetek preskusa

25. Spolno aktivne odrasle ribe, uporabljene za začetek generacije F0 za preskus, se izberejo na podlagi dveh meril: starosti (običajno več kot 12 tpo, vendar se priporoča, da ne več 16 tpo) in teže (ki mora biti ≥ 300 mg za samice in ≥ 250 mg za samce).

26. Pari samic in samcev, ki izpolnjujejo zgornje specifikacije, se kot posamezni pari prenesejo v vsak ponovitveni akvarij, tj. 12 ponovljenih vzorcev v kontrolah in šest ponovljenih vzorcev v tretiranih s kemikalijo na začetku preskusa. Tem akvarijem se naključno dodelita tretirana skupina (npr. T1–T5 in kontrola) in ponovljeni vzorec (npr. A–L v kontrolah in A–F v tretirani skupini), nato pa se vstavijo v sistem izpostavljenosti z ustreznim tokom v vsak akvarij.

Pogoji izpostavljenosti

27. Celotni povzetek parametrov in pogojev preskusa je na voljo v Dodatku 3. Ob upoštevanju teh specifikacij bi morale imeti kontrolne ribe vrednosti končnih točk podobne tistim, ki so navedene v Dodatku 4.
28. Med preskusom je treba meriti raztopljeni kisik, pH in temperaturo v vsaj eni preskusni posodi vsake tretirane skupine in kontrole. Te meritve, razen temperature, je treba izvesti vsaj enkrat tedensko v celotnem obdobju izpostavljenosti. Srednja temperatura vode med celotnim trajanjem študije mora biti med 24 in 26 °C. Temperaturo je treba meriti vsak dan v celotnem obdobju izpostavljenosti. Vrednost pH vode mora biti med 6,5 in 8,5, znotraj enega preskusa pa mora biti v območju $\pm 0,5$ pH enote. Ponovljeni vzorci v okviru tretiranja se ne smejo statistično razlikovati drug od drugega in tretirane skupine v okviru preskusa se ne smejo statistično razlikovati druga od druge (na podlagi dnevnih meritev temperature in brez kratkotrajnih odstopanj).

Trajanje izpostavljenosti

29. V preskusu so spolno aktivne ribe iz generacije F0 izpostavljene tri tedne. V četrtem tednu se približno na 24. dan preskusa vzpostavi generacija F1, pari za razmnoževanje generacije F0 pa se humano usmrtijo, pri čemer se evidentirata teža in dolžina (glej odstavek 34). Temu sledi izpostavljenost generacije F1 dodatnih 14 tednov (skupaj 15 tednov za generacijo F1) in generacije F2 dva tedna do izvalitve. Skupno trajanje preskusa je v glavnem 19 tednov (tj. do izvalitve generacije F2). Časovni okviri za preskus so prikazani v preglednici 2 in podrobneje pojasnjeni v Dodatku 9.

Način hranjenja

30. Ribe se lahko hranijo s solinskimi rakci vrste *Artemia* (24 ur starimi navpliji) *ad libitum*, ki se lahko po potrebi dopolnijo s hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu. Hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu, je treba redno analizirati glede prisotnosti onesnaževal, kot so organoklorni pesticidi, policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) in poliklorirani bifenili (PCB). Izogibati se je treba hrani z visoko ravno endokrinih aktivnih snovi (tj. fitoestrogenov), ki bi lahko ogrozila odziv preskusa. Nezaužito hrano in iztrebke je treba odstraniti iz preskusnih posod v skladu z zahtevami, npr. s previdnim čiščenjem dna posameznega akvarija z uporabo sesalne natege. Enkrat ali dvakrat na teden je treba očistiti tudi stranice in dno vsakega akvarija (npr. s krtačenjem). Primer časovnega razporeda hranjenja je v Dodatku 5. Stopnja hranjenja temelji na številu rib na ponovljeni vzorec in se torej zmanjša v primeru poginov v ponovljenem vzorcu.

Analitsko določanje in meritve

31. Pred začetkom obdobja izpostavljenosti je treba zagotoviti ustrezno delovanje sistema za dovajanje kemikalije. Vzpostaviti je treba vse potrebne analitske metode, vključno z zadostnim znanjem o stabilnosti kemikalije v preskusnem sistemu. Med preskusom se koncentracije preskusne kemikalije določajo v ustreznih časovnih razmikih, po možnosti vsaj vsak teden v enem ponovljenem vzorcu za vsako tretirano skupino, pri čemer se vsak teden rotira med ponovljenimi vzorci iste tretirane skupine.
32. Med preskusom je treba v časovnih razmikih ustrezno preverjati pretok razredčila in osnovne raztopine (npr. najmanj trikrat tedensko). Priporočljivo je, da rezultati temeljijo na izmerjenih koncentracijah. Če pa se je koncentracija preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževala znotraj ± 20 % srednjih izmerjenih vrednosti ves čas preskusa, lahko rezultati temeljijo na nominalnih ali izmerjenih vrednostih. V primeru kemikalij, ki se opazno kopičijo v ribah, se lahko preskusne koncentracije znižajo, ko ribe zrastejo. V takih primerih je priporočljivo, da se v vsaki komori prilagodi stopnja izmenjave preskusne raztopine, da bi preskusne koncentracije ostale čim bolj konstantne.

Opažanja in izmerjene končne točke

33. Izmerjene končne točke za oceno mogočih učinkov na ravni populacije vključujejo plodnost, fertilnost, izvalitev, rast in preživetje. Vsak dan je treba opazovati tudi obnašanje in zabeležiti vsako neobičajno obnašanje. Druge mehanistične končne točke vključujejo mRNK vtg ali ravni proteina VTG v jetrih z imunološkim preskusom (28), spolne fenotipske označevalce, kot so značilne papile na predrepni plavuti pri samcih, histološko oceno gonadnega spola in histopatološko oceno ledvic, jeter in spolnih žlez (glej seznam končnih točk v preglednici 1). Vse te specifične končne točke se ocenijo v okviru določitve genetskega spola posameznega osebkov na podlagi prisotnosti ali odsotnosti gena za določitev moškega spola *dmy* pri medaki (glej odstavek 41). Poleg tega se oceni tudi čas za drstenje. Na podlagi informacij iz štetja papil na predrepni plavuti se lahko izpeljejo tudi preprosta fenotipska razmerja med spoloma, da se posamezne medake fenotipsko opredelijo kot samci ali samice. Za to preskusno metodo se ne pričakuje, da bodo z njo zaznana majhna odstopanja od pričakovanega razmerja med spoloma, ker razmeroma majhno število rib na ponovljeni vzorec ne bo zagotovilo zadostne statistične moči. Prav tako se med histopatološko oceno ocenijo spolne žleze in izvedejo veliko močnejše analize za oceno fenotipa spolnih žlez v okviru genetskega spola.
34. Glavni namen te preskusne metode je oceniti morebitne učinke preskusne kemikalije, ki so pomembni za populacijo. Tudi mehanistične končne točke (VTG, SSZ in nekateri učinki na histopatološke spremembe spolnih žlez) lahko pomagajo pri ugotovitvi, ali endokrino delovanje sproži kakršen koli učinek. Vendar pa lahko na te mehanistične končne točke vplivajo tudi sistemske in druge toksičnosti. Zato se lahko podrobno ocenijo tudi histopatološke spremembe jeter in ledvic, da bi bolje razumeli kakršne koli odzive v mehanističnih končnih točkah. Če se te podrobne ocene ne izvedejo, je treba še vedno zabeležiti in sporočiti večje nepravilnosti, naključno ugotovljene med histopatološko oceno.

Humana usmrnitev rib

35. Ob končani izpostavljenosti generacij F0 in F1 in ko se vzamejo podvzorci mladostnih osebkov, je treba ribe evtanazirati s primernimi količinami raztopine za anestezijo (npr. trikain metan sulfonat, MS-222 (št. CAS 886-86-2, 100–500 mg/l), pufran s 300 mg/l NaHCO₃ (natrijev bikarbonat, št. CAS 144-55-8)), da se zmanjša draženje sluznice. Če so pri ribah vidni znaki precejšnjega trpljenja (zelo hudo trpljenje, pogin je mogoče zanesljivo napovedati) in se obravnavajo kot umirajoče, je treba živali anestezirati in evtanazirati ter jih za analizo podatkov obravnavati kot smrtne primere. Kadar se ribe evtanazirajo zaradi obolevnosti, je to treba zabeležiti in sporočiti. Odvisno od tega, kdaj med študijo so ribe evtanazirane, se lahko zadržijo za histopatološko analizo (fiksiranje rib za morebitno histopatologijo).

Ravnanje z ikrami in larvalnimi ribami

Odvzem iker od parov za razmnoževanje za razmnožitev naslednje generacije

36. Ikre se odvzamejo prvi dan (ali po potrebi prva dva dneva) 4. tedna preskusa za prehod z generacije F0 na generacijo F1 in 18. tedna preskusa za prehod z generacije F1 na generacijo F2. 18. teden preskusa ustreza generaciji F1, odraslim ribam 15 tpo (tednov po oploditvi). Pomembno je, da se dan pred začetkom odvzema iker odstranijo vse ikre iz vsakega akvarija, s čimer se zagotovi, da so vse ikre, odvzete od para za razmnoževanje, iz enega drstenja. Po drstenju samice medake včasih ikre nosijo blizu zadnjične odprtine, dokler iker ni mogoče odložiti na substrat. Če v akvariju ni substrata, je mogoče ikre najti pritrdjene na samico ali na dnu akvarija. Odvisno od tega, kje so, se ikre bodisi previdno odstranijo s samice bodisi izsajajo z dna v 4. tednu preskusa pri generaciji F0 in 18. tednu preskusa pri generaciji F1. Vse ikre, odvzete v okviru tretiranja, se pred razdelitvijo v inkubacijske komore združijo.
37. Filamente iker, ki povezujejo odložene ikre, je treba odstraniti. Oplodjene ikre (do 20) se odvzamejo od vsakega para za razmnoževanje (1 par na ponovljeni vzorec), združijo po tretiranjih in sistematično razdelijo v primerne inkubacijske komore (dodatka 6 in 7). Z zelo kakovostnim stereomikroskopom je mogoče videti znake zgodnje oploditve/razvoja, kot so dvig oploditvene membrane (horijske), delitev celic ali oblikovanje blastule. Inkubacijske komore se lahko vstavijo v ločene 'inkubacijske akvarije', vzpostavljene za vsako tretiranje (v takem primeru je treba v njih meriti parametre kakovosti vode in koncentracije preskusne kemikalije), ali v ponovljeni akvarij, v katerem bodo izvaljene ličinke (npr. zarod z mešičkom). Če je potreben drugi dan odvzema (23. dan preskusa), je treba združiti vse ikre obeh dni in jih nato sistematično porazdeliti v vsakega od ponovljenih vzorcev tretiranja.

Gojenje iker do izvalitve

38. Oplojene ikre se stalno mešajo, npr. z zračnimi mehurčki v inkubatorju za ikre ali navpičnim nihanjem inkubatorja za ikre. Vsak dan se preverja in evidentira smrtnost oplojenih iker (zarodkov). Odmrle ikre se odstranijo iz inkubatorjev (Dodatek 9). 7. dan po oploditvi (dpo) se mešanje ustavi ali zmanjša, da se oplojene ikre usedejo na dno inkubatorja. S tem se spodbudi izvalitev, ki se običajno zgodi naslednjega dne ali v naslednjih dveh dneh. Za vsako tretiranje in kontrolo se preštejejo izvaljene ličinke (mlade ličinke; zarod z mešičkom) (na podlagi združitve ponovljenih vzorcev). Oplojene ikre, ki se ne izvalijo do dvakratnika srednjega dne izvalitve v kontroli (običajno 16. ali 18. dpo), se štejejo za neviabilne in se zavržejo.
39. V vsak ponovitveni akvarij se prenese dvanajst izvaljenih ličink. Izvaljene ličinke iz inkubacijskih komor se združijo in sistematično razdelijo v ponovitvene akvarije (Dodatek 7). To je mogoče storiti tako, da se izvaljene ličinke naključno izberejo iz tretirane skupine in nato nediskriminatorno zaporedoma dodajajo v ponovitvene akvarije. Vsak akvarij mora vsebovati enako število ($n = 12$) izvaljenih ličink (vsak največ 20 ličink). Če ni dovolj izvaljenih ličink za zapolnitev vseh ponovljenih vzorcev tretiranja, je priporočljivo zagotoviti, da ima čim več ponovljenih vzorcev 12 izvaljenih ličink. Z ličinkami je mogoče varno ravhati s steklenimi pipetami s široko odprtino. Vse dodatne izvaljene ličinke je treba humano usmrtiti z anestetikom. V nekaj tednih pred vzpostavitvijo parov za razmnoževanje je treba evidentirati dan, ko je v posameznem ponovljenem vzorcu opaženo prvo drstenje.

Vzpostavitev parov za razmnoževanje*Odščip plavuti in določitev genotipskega spola*

40. Genotipski spol z odščipom plavuti se določi od 9 do 10 tpo (tj. 12.–13. teden preskusa za generacijo F1). Vse ribe v akvariju se anestetizirajo (z odobrenimi metodami, npr. IACUC), z zgornjega ali spodnjega konca repne plavuti vsake ribe pa se odvzame majhen vzorec tkiva za določitev genotipskega spola osebkov (29). Ribe iz ponovljenega vzorca se lahko namestijo v majhnih kletkah, po možnosti ena na kletko, v ponovitvenem akvariju. Alternativno sta lahko v vsaki kletki dve ribi, če ju je mogoče razlikovati. Ena metoda je, da se pri odvzemu vzorca tkiva različno odreže repna plavut (npr. z zgornjega ali spodnjega konca repne plavuti).
41. Genotipski spol medake se določi z identificiranim in sekvenciranim genom (*dmy*), ki se nahaja na kromosomu Y. Prisotnost *dmy* kaže osebek z geni XY ne glede na fenotip, medtem ko odsotnost *dmy* kaže osebek z geni XX ne glede na fenotip (30); (31). Iz vsakega dela odščipljene plavuti se ekstrahira deoksiribonukleinska kislina (DNK), prisotnost ali odsotnost *dmy* pa se lahko določi z metodami verižne reakcije s polimerazo (PCR) (glej Dodatek 9 v poglavju C.41 te priloge ali dodatka 3 in 4 v (29)).

Vzpostavitev parov za razmnoževanje

42. Informacije o genotipskem spolu se uporabijo za vzpostavitev parov za razmnoževanje XX-XY ne glede na zunanji fenotip, ki se lahko spremeni z izpostavljenostjo preskusni kemikaliji. Na dan po določitvi genotipskega spola vsake ribe se iz vsakega ponovljenega vzorca naključno izberejo dve ribi XX in dve ribi XY ter vzpostavita dva para za razmnoževanje XX-XY. Če v ponovljenem vzorcu ni bodisi dveh rib XX bodisi dveh rib XY, je treba ustrezne ribe pridobiti iz drugih ponovljenih vzorcev v okviru tretiranja. Prednostna naloga je, da je v vsakem tretiranju in v kontrolah (24) priporočeno število ponovitvenih parov za razmnoževanje (12). Ribe z očitnimi nepravilnostmi (težave s plavalnim mehurjem, deformacije hrbtenice, izjemne razlike v velikosti itd.) se pri vzpostavljanju parov za razmnoževanje izključijo. V fazi razmnoževanja za generacijo F1 mora vsak ponovitveni akvarij vsebovati le en par za razmnoževanje.

Vzorčenje mladostnih osebkov in ocena končnih točk*Vzorčenje rib, ki niso vključene v pare za razmnoževanje*

43. Po vzpostavitvi parov za razmnoževanje se ribe, ki niso bile izbrane za nadaljnje razmnoževanje, humano usmrtijo za meritev končnih točk pri mladostnih osebkih v 12.–13. tednu preskusa (F1). Izjemno pomembno je, da se z ribami ravna tako, da je pri posamezni ribi še vedno mogoče ugotoviti genotipski spol, določen za izbiro parov za razmnoževanje. Vsi zbrani podatki se analizirajo v okviru genotipskega spola posameznih rib. Vsaka riba se uporabi

za različne meritve končnih točk, med drugim za: določitev stopenj preživetja mladic/mladostnih osebkov (7.–12./13. teden preskusa (F1)), rasti v dolžino (standardna dolžina se lahko izmeri, če je bila repna plavut skrajšana zaradi vzorčenja za analizo genetskega spola. Skupna dolžina se lahko izmeri, če se za *dmy* vzorči le delček zgornjega ali spodnjega konca repne plavuti) in telesne teže (tj. mokra teža, osušena s pivnikom), mRNA *vtg* (ali VTG) v jetrih in papil na predrepni plavuti (glej preglednici 1 in 2). Upoštevajte, da so za izračun srednje rasti v tretirani skupini potrebne tudi teže in dolžine parov za razmnoževanje.

Vzorčenje tkiva in meritev vitelogenina

44. Jetra se do meritev mRNA *vtg* (ali VTG) secirajo in shranijo pri $\leq -70^{\circ}\text{C}$. Rep ribe, vključno s predrepno plavutjo, se shrani v ustreznem fiksativu (npr. Davidsonovem) ali fotografira, tako da je mogoče pozneje prešteti papile na predrepni plavuti. Po želji se lahko sočasno vzorčijo in shranijo druga tkiva (tj. spolne žleze). Koncentracijo VTG v jetrih je treba kvantificirati s homologno tehniko ELISA (glej priporočene postopke za medako v Dodatku 6 in poglavju C.48 te priloge). Agencija U.S. EPA je vzpostavila tudi metode za kvantificiranje mRNA *vtg*, tj. ekstrakcijo mRNA gena *vtg I* iz vzorca jeter in kvantificiranje števila kopij gena *vtg I* (na ng skupne mRNA) s kvantitativno metodo PCR (29). Namesto določitve števila kopij gena *vtg* v kontrolnih in tretiranih skupinah je virom bolj prijazna in tehnično ne tako težavna metoda določitev relativne (stopenjske) spremembe v izražanju *vtg I* v kontrolnih in tretiranih skupinah.

Sekundarne spolne značilnosti

45. V običajnih okoliščinah imajo samo spolno zreli samci medake papile, ki se razvijejo na ploščicah nekaterih plavutnic predrepne plavuti kot sekundarna spolna značilnost in so lahko potencialni biooznačevalci za motnje endokrinega sistema. Metoda štetja papil na predrepni plavuti (število ploščic s papilami) je navedena v Dodatku 8. Število papil na predrepni plavuti na posamezni osebek se uporabi tudi, da se navedeni osebek glede na zunanji fenotip kategorizira kot samec ali samica za namen izračuna preprostega razmerja med spoloma v ponovljenem vzorcu. Medaka, pri kateri število presega 0, je opredeljena kot samec; medaka, pri kateri je število papil na predrepni plavuti 0, je opredeljena kot samica.

Ocena plodnosti in fertilnosti

46. Plodnost in fertilnost se v generaciji F0 ocenjujeta od 1. do 3. tedna preskusa, v generaciji F1 pa od 15. do 17. tedna preskusa. Ikre se pri vsakem paru za razmnoževanje odvajajo vsak dan 21 zaporednih dni. Ikre se vsako jutro nežno odstranijo z ujetih samic in/ali izsesajo z dna akvarija. Za vsak ponovljeni par za razmnoževanje se vsak dan evidentirata plodnost in fertilnost. Plodnost je opredeljena kot število odloženih iker, fertilnost pa je funkcionalno opredeljena kot število oplojenih in viabilnih iker v času štetja. Ikre je treba prešteti čim prej po odvzemu.
47. Plodnost v ponovljenem vzorcu se vsak dan evidentira kot število iker na par za razmnoževanje, ki se analizira s priporočenimi statističnimi postopki z uporabo srednjih vrednosti za ponovljeni vzorec. Fertilnost v ponovljenem vzorcu je vsota števila fertilnih iker, ki jih proizvede par za razmnoževanje, deljena z vsoto števila iker, ki jih proizvede ta par. Statistično se fertilnost analizira kot delež na ponovljeni vzorec. Valilnost v ponovljenem vzorcu je število izvaljenih ličink, deljeno s številom vnesenih zarodkov (običajno 20). Statistično se valilnost analizira kot delež na ponovljeni vzorec.

Vzorčenje odraslih rib in ocena končnih točk

Vzorčenje rib, ki so vključene v pare za razmnoževanje

48. Po 17. tednu preskusa (tj. potem ko se je generacija F2 uspešno začela) se odrasle ribe generacije F1 humano usmrtijo in ocenijo različne končne točke (glej preglednici 1 in 2). Predrepna plavut se slika za oceno papil na predrepni plavuti (glej Dodatek 8) in/ali pa se rep takoj za zadnjično odprtino odstrani in fiksira za poznejše štetje papil. Ob tem se lahko po želji vzame vzorec dela repne plavuti in shrani za preverjanje genetskega spola (*dmy*). Po potrebi se lahko vzame vzorec tkiva, da se ponovi analiza *dmy* za preverjanje genetskega spola posameznih rib. Telesna votlina se odpre, da se omogoči perfuzija z ustreznimi fiksativi (npr. Davidsonovim), preden se celoten trup potopi v fiksativ. Če pa se pred fiksacijo opravi ustrezna permeabilizacija, telesne votline ni treba odpirati.

Histopatologija

49. Pri vsaki ribi se histološko ocenijo patološke spremembe tkiva spolnih žlez (30); (29). Kot je navedeno v odstavku 33, lahko na druge mehanistične končne točke, ocenjene v tem preskusu (tj. VTG, SSZ in nekateri učinki na histopatološke spremembe spolnih žlez), vplivajo sistemske ali druge toksičnosti. Zato se lahko podrobno ocenijo tudi histopatološke spremembe jeter in ledvic, da bi bolje razumeli kakršne koli odzive v mehanističnih končnih točkah. Če se te podrobne ocene ne izvedejo, je treba še vedno zabeležiti in sporočiti večje nepravilnosti, naključno ugotovljene med histopatološko oceno. Čeprav se priporoča upoštevanje smernic o histopatologiji (29), bi bilo mogoče pregledati in primerjati ('reading down') tretirane skupine z največjim učinkom (v primerjavi s kontrolo) in tretirane skupine brez učinka. Običajno se vsi vzorci obdelajo/segmentirajo, nakar jih preuči patolog. Če se uporabi tak primerjalni pristop ('read-down'), je treba navesti, da se pri postopku Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) uporablja pričakovanje, da se s povečanjem odmerka poveča tudi biološki učinek (patologija). Če se torej proučuje samo en velik odmerek brez kakršnih koli vmesnih odmerkov, bo moč izgubljena. Če statistična analiza ni potrebna za ugotovitev, da velik odmerek nima učinka, potem je ta pristop lahko sprejemljiv. Iz te ocene se izpelje tudi fenotip spolnih žlez.

Druga opazanja

50. S preskusom MEOGRT se zagotovijo podatki, ki se lahko uporabijo (npr. pri pristopu, ki temelji na zanesljivosti dokazov), da se sočasno ocenita najmanj dve splošni vrsti poteka neželenega izida (AOP), ki se konča z reproduktivno okvaro: (a) endokrine poti, ki vključujejo motnje na endokrini osi hipotalamus-hipofiza-spolne žleze (HPG), ter (b) poti, ki povzročajo zmanjšanja preživetja, rasti (dolžina in teža) in razmnoževanja z neendokrino toksičnostjo. V ta preskus so vključene tudi končne točke, ki se običajno merijo pri preskusih kronične toksičnosti, kot sta preskus v celotnem življenjskem ciklu in preskus v zgodnjem življenjskem obdobju, ter se lahko uporabijo za oceno nevarnosti, ki jo predstavljata neendokrino toksično delovanje in mehanizem endokrine toksičnosti. Med preskusom je treba obnašanje opazovati dnevno in zabeležiti vsako neobičajno obnašanje. Poleg tega je treba evidentirati vsak pogin ter izračunati preživetje do izločitve rib (6. do 7. teden preskusa), preživetje po izločitvi do vzorčenja mladostnih osebkov (9. do 10. tpo) in preživetje od vzpostavitve parov do vzorčenja odraslih rib.

*Preglednica 1***Pregled končnih točk preskusa MEOGRT (*)**

Življenjsko obdobje	Končna točka	Generacija
Zarodek (2 tpo)	Izvalitev (% in čas do izvalitve)	F1, F2
Mladica (4 tpo)	Preživetje	F1
Mladostni osebki (9 ali 10 tpo)	Preživetje	F1
	Rast (dolžina in teža)	
	Vitelogenin (mRNK ali protein)	
	Sekundarne spolne značilnosti (papile na predrepni plavuti)	
	Zunanje razmerje med spoloma	
	Čas do 1. drstenja	
Odrasla riba (12 do 14 tpo)	Razmnoževanje (plodnost in fertilnost)	F0, F1
Odrasla riba (15 tpo)	Preživetje	F1
	Rast (dolžina in teža)	
	Sekundarne spolne značilnosti (papile na predrepni plavuti)	
	Histopatologija (spolne žleze, jetra, ledvice)	

(*) Te končne točke je treba statistično analizirati.

ČASOVNI OKVIR

51. Časovni okvir za preskus MEOGRT v preglednici 2 prikazuje preskus. Preskus MEOGRT vključuje 4 tedne izpostavljenosti odraslih rib generacije F0 in 15 tednov izpostavljenosti generacije F1 ter obdobje izpostavljenosti druge generacije (F2) do izvalitve (2 tpo). Dejavnost v času preskusa MEOGRT je povzeta v Dodatku 9.

Preglednica 2

Časovni okvir izpostavljenosti in meritev končnih točk za preskus MEOGRT

Časovni okvir izpostavljenosti in končnih točk za preskus MEOGRT																			
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																	1	2	
Teden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Ključno življenjsko obdobje					Zarodek			Ličinka			Mladica			Mladostni osebek			Odrasla riba		
Končne točke																			
Plodnost	F ₀														F ₁				
Fertilnost	F ₀														F ₁				
Izvalitev					F ₁													F ₂	
Preživetje					F ₁							F ₁						F ₁	
Rast				F ₀								F ₁						F ₁	
Vitelogenin												F ₁							
Sekundarne spolne												F ₁						F ₁	
Histopatologija																		F ₁	
Teden preskusa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- V načrtu poskusa je 7 skupin ponovljenih vzorcev
 - 5 za tretiranja s preskusno kemikalijo
 - 2 za kontrolna tretiranja (4, če se uporabi topilo)
- Zasnova v skupini
 - 12 ponovljenih vzorcev za razmnoževanje, patologijo odraslih osebkov in SSZ (od 10. do 18. ted.)
 - 6 ponovljenih vzorcev za izvalitev, preživetje, Vtg; ter SSZ in rast pri mladostnih osebkih (od 1. do 9. ted.)

SSZ: sekundarne spolne značilnosti; ted.: tedni;
Vtg: vitelogenin

- V načrtu poskusa je 7 skupin ponovljenih vzorcev
 - 5 za tretiranja s preskusno kemikalijo
 - 2 za kontrolna tretiranja (4, če se uporabi topilo)
 - Zasnova v skupini
 - 12 ponovljenih vzorcev za razmnoževanje, patologijo odraslih osebkov in SSZ (od 10. do 18. ted.)
 - 6 ponovljenih vzorcev za izvalitev, preživetje, Vtg; ter SSZ in rast pri mladostnih osebkih (od 1. do 9. ted.)
- SSZ: sekundarne spolne značilnosti; ted.: tedni;
Vtg: vitelogenin

PODATKI IN POROČANJE

Statistična analiza

52. Ker je genotipski spol določen za vse preskusne ribe, je treba podatke analizirati ločeno za vsak genotipski spol (tj. XY samce in XX samice). Brez tega se bo statistična moč analize močno zmanjšala. Priporočljivo je, da se pri statističnih analizah podatkov upoštevajo postopki, opisani v dokumentu OECD z naslovom Sedanji pristopi k statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo (32). Dodatek 10 vsebuje nadaljnje smernice za statistično analizo.
53. Načrt preskusa in izbira statističnih testov morata zagotavljati ustrezno moč opažanja biološko pomembnih sprememb pri končnih točkah, kjer se poroča o NOEC (32). Poročanje o pomembnih koncentracijah z učinkom in parametrih je lahko odvisno od regulativnega okvira. Opredeliti je treba odstotek spremembe pri vsaki končni točki, ki je pomemben za zaznavanje ali oceno. Poskus mora biti zasnovan tako, da to omogoča. Enak odstotek spremembe najverjetneje ne bo veljal za vse končne točke, poleg tega izvedljivega poskusa najverjetneje ne bo mogoče zasnovati tako, da bodo ta merila izpolnjena pri vseh končnih točkah, zato se je treba pri ustreznem načrtovanju poskusa osredotočiti na končne točke, ki so pomembne za poskus. Statistični diagram in smernice so na voljo v Dodatku 10; namenjeni so pomoči pri obdelavi podatkov in izbiri najustreznejšega statističnega testa ali modela. Lahko se uporabijo tudi drugi statistični pristopi, vendar le, če so znanstveno utemeljeni.

54. Variacije je treba v vsakem nizu ponovljenih vzorcev analizirati z analizo variance ali s postopki kontingenčne tabele ter na podlagi zgornje analize izbrati zadostne in ustrezne metode statistične analize. Da bi naredili večkratno primerjavo med rezultati pri posameznih koncentracijah in rezultati kontrol, se za zvezne odzive priporoča uporaba regresijskega postopka (npr. testa po Jonckheere-Terpstraju). Kadar podatki niso skladni z monotonim odzivom na koncentracijo, je treba uporabiti Dunnettov test ali Dunnov test (po ustrezni pretvorbi podatkov, če je to potrebno).
55. Za opredelitev plodnosti se ike štejejo dnevno, vendar se lahko analizirajo kot skupno število iker ali kot ponovljena meritev. Dodatek 10 vsebuje podrobnosti o tem, kako se analizira ta končna točka. Za histopatološke podatke, ki so v obliki ocen resnosti, je bil razvit nov statistični test, tj. Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).
56. Poročati je treba o vseh končnih točkah, opaženih pri tretiranjih s kemikalijo, ki se bistveno razlikujejo od ustreznih kontrol.

Pomisleki o analizi podatkov

Uporaba ogroženih stopenj tretiranja

57. Pri določanju, ali se očitna toksičnost kaže pri ponovljenem vzorcu ali celotnem tretiranju, se obravnava več dejavnikov, ki jih je treba izključiti iz analize. Očitna toksičnost je opredeljena kot > 4 smrtni primeri v katerem koli ponovljenem vzorcu med 3. in 9. tpo, ki jih ni mogoče pojasniti s tehnično napako. Drugi znaki očitne toksičnosti vključujejo hemoragijo, nenormalno obnašanje, nenormalne načine plavanja, anoreksijo in katere koli druge klinične znake bolezni. Za subletalne znake toksičnosti bodo lahko potrebne kvalitativne ocene, ki jih je vedno treba izvesti za kontrolno skupino z vodo za redčenje (samo čista voda). Če je očitna toksičnost opazna pri najbolj obremenjenih tretiranjih, je priporočljivo, da se ta tretiranja izključijo iz analize.

Kontrole s topilom

58. Uporabo topila je treba obravnavati le kot zadnjo možnost, ko so bile obravnavane že vse druge možnosti dovajanja kemikalije. Če se uporabi topilo, je treba skladno izvesti kontrolo z vodo za redčenje. Ob koncu preskusa je treba izvesti oceno potencialnih učinkov topila. Ocena se izvede s statistično primerjavo kontrolne skupine s topilom in kontrolne skupine z vodo za redčenje. Najpomembnejše končne točke, ki jih je treba obravnavati v tej analizi, so dejavniki rasti (teža), saj lahko nanje vplivajo splošne toksičnosti. Če se pri teh končnih točkah ugotovijo statistično značilne razlike med kontrolno skupino z vodo za redčenje in kontrolno skupino s topilom, je treba za ugotovitev, ali je veljavnost preskusa ogrožena, uporabiti najboljšo strokovno presojo. Če se dve kontrolni skupini razlikujeta, je treba tretirane skupine, izpostavljene kemikaliji, primerjati s kontrolo s topilom, razen če je znano, da je zaželena primerjava s kontrolo z vodo za redčenje. Če med dvema kontrolnima skupinama ni statistično značilne razlike, se priporoča, da se tretirane skupine, izpostavljene preskusni kemikaliji, primerjajo z združenima kontrolnima skupinama (kontrolno skupino s topilom in kontrolno skupino z vodo za redčenje), razen če je znano, da je zaželena le primerjava s kontrolno skupino z vodo za redčenje ali kontrolno skupino s topilom.

Poročilo o preskusu

59. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija: fizikalne lastnosti in, če je ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki.

Snov iz ene sestavine:

— fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;

— kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo itd. (vključno z vsebnostjo organskega ogljika, če je to ustrezno).

Snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

- čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Preskusna vrsta:

- znanstveno ime, sev, če je na voljo, vir, metoda zbiranja oplojenih iker in nadaljnje ravnanje.

Preskusni pogoji:

- obdobje osvetljenosti;
- načrt preskusa (npr. velikost, material in vodna prostornina komor, število preskusnih komor in ponovljenih vzorcev, število izvaljenih ličink na ponovljeni vzorec);
- metoda priprave osnovnih raztopin in pogostost obnavljanja (navesti je treba sredstvo za raztapljanje in njegovo koncentracijo, če je uporabljeno);
- metoda odmerjanja preskusne kemikalije (npr. črpalke, sistemi za redčenje);
- analitski izkoristek metode in nominalne preskusne koncentracije, meja določljivosti, srednje izmerjene vrednosti in njihovi standardni odkloni v preskusnih posodah ter metoda, po kateri so bile pridobljene, in dokazi, da se meritve nanašajo na koncentracije preskusne kemikalije v dejanski raztopini;
- značilnosti vode za redčenje: pH, trdota, temperatura, koncentracija raztopljenega kisika, ravni preostalega klora (če so bile merjene), skupni organski ogljik (če je bil merjen), suspendirane trdne snovi (če so bile merjene), slanost preskusnega medija (če je bila merjena) in druge izvedene meritve;
- nominalne preskusne koncentracije, srednje izmerjene vrednosti in njihovi standardni odkloni;
- kakovost vode v preskusnih posodah: pH, temperatura (merjena vsak dan) in koncentracija raztopljenega kisika;
- podrobne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, vir, dana količina in pogostost).

Rezultati:

- dokazi, da so kontrole izpolnjevale splošna merila za veljavnost;
- podatki za kontrolno skupino (in kontrolo s topilom, kadar se uporabi) in tretirano skupino, kot so izvalitev (valilnost in čas do izvalitve) za F1 in F2, preživetje po izvalitvi za F1, rast (dolžina in telesna teža) za F1, genotipski spol in razlikovanje med spoloma (npr. sekundarne spolne značilnosti na podlagi papil na predrepni plavuti in histologije spolnih žlez) za F1, fenotipski spol za F1, sekundarne spolne značilnosti (papile na predrepni plavuti) za F1, mRNK vtg (ali protein VTG) za F1, histopatološka ocena (spolne žleze, jetra in ledvice) za F1 in razmnoževanje (plodnost in fertilnost) za F0, F1; (glej preglednici 1 in 2);
- pristop k statistični analizi (regresijska analiza ali analiza variance) in obdelava podatkov (uporabljeni statistični testi in modeli);
- koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) za vsak ocenjeni odziv;

- najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC) za vsak ocenjeni odziv ($p = 0,05$); EC_x za vsak ocenjeni odziv, če je ustrezno, intervali zaupanja (npr. 90- ali 95-odstotni) in graf prilagojenega modela, uporabljenega za izračun, naklon krivulje odziva na koncentracijo, formula regresijskega modela, ocenjeni parametri modela in njihove standardne napake;
 - vsako odstopanje od te preskusne metode in odkloni od meril za sprejemljivost ter razmisleki o morebitnih posledicah za rezultat preskusa.
60. Za rezultate meritev končnih točk je treba predstaviti srednje vrednosti in njihove standardne odklone (na podlagi ponovljenih vzorcev in koncentracij, če je mogoče).

VIRI

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 171), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (2) Padilla, S., Cowden, J., Hinton, D. E., Yuen, B., Law, S., Kullman, S. W., Johnson, R., Hardman, R. C., Flynn, K., in Au, D. W. T. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1–36.
- (3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (4) Benoit, D. A., Mattson, V. R., Olson, D. L. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457–464.
- (5) Yokota, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Nakazono, A., Honjo, T., in Kobayashi, K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925–1930.
- (6) Yokota, H., Seki, M., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Honjo, T., in Kobayashi, K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552–2560.
- (7) Kang, I. J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokoro, H., in Honjo, T. (2002). Effects of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71–80.
- (8) Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Tadokoro, H., in Kobayashi, K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692–1698.
- (9) Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Maeda, M., Tadokoro, H., in Kobayashi, K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487–1496.
- (10) Hirai, N., Nanba, A., Koshio, M., Kondo, T., Morita, M., in Tatarazako, N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288–295.
- (11) Hirai, N., Nanba, A., Koshio, M., Kondo, T., Morita, M., in Tatarazako, N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78–86.

- (12) Nakamaura, A., Tamura, I., Takanobu, H., Yamamuro, M., Iguchi, T., in Tatarazako, N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11-23.
- (13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Na voljo na: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (14) Adolfsson-Erici, M., Åkerman, G., Jahnke, A., Mayer, P., in McLachlan, M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593–599.
- (15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 23.), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (16) Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M. J., in Pickford, D. B. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Review. Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- (17) Denny, J. S., Spehar, R. L., Mead, K. E., in Yousuff, S. C. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (18) Koger, C. S., Teh, S. J., in Hinton, D. E. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287–1293.
- (19) Kinoshita, M., Murata, K., Naruse, K., in Tanaka, M. (2009). *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols*, Wiley- Blackwell.
- (20) Gormley, K., in Teather, K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330–338.
- (21) Poglavje C.15 te priloge: Ribe, preskus kratkotrajne toksičnosti na embriih in mladiah s hranilnim mešičkom.
- (22) Poglavje C.37 te priloge: 21-dnevni preskus rib: Kratkotrajno presejalno preskušanje estrogenega in androgenega delovanja ter zaviranja aromataze.
- (23) Poglavje C.41 te priloge: Preskus spolnega razvoja rib.
- (24) Poglavje C.48 te priloge: Kratkotrajni preskus razmnoževanja rib.
- (25) Poglavje C.47 te priloge: Ribe, preskus toksičnosti za zgodnje razvojne stopnje.

- (26) Poglavje C.49 te priloge: Preskus akutne toksičnosti ribjega zarodka.
- (27) Wheeler, J. R., Panter, G. H., Weltje, L., in Thorpe, K. L. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067–1076.
- (28) Tatarazako, N., Koshio, M., Hori, H., Morita, M., in Iguchi, T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301–308.
- (29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 227). Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (30) Nanda, I., Hornung, U., Kondo, M., Schmid, M., in Scharl, M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245–251.
- (31) Shinomiya, A., Otake, H., Togashi, K., Hamaguchi, S., in Sakaizumi, M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613–619.
- (32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Pariz.
- (33) Green, J. W., Springer, T. A., Saulnier, A. N., in Swintek, J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108–1116.

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Kemikalija: snov ali zmes.

ELISA: encimski imunski test.

Plodnost = število iker.

Fertilnost = število viabilnih iker/plodnost.

Dolžina do razcepa repne plavuti (FL): je dolžina od konice nosu do konca zajede med repnima plavutnicama in se uporablja za ribe, pri katerih je težko določiti, kje se konča hrbtenica (www.fishbase.org).

Valilnost = izvaljene ličinke/število zarodkov, vloženih v inkubator.

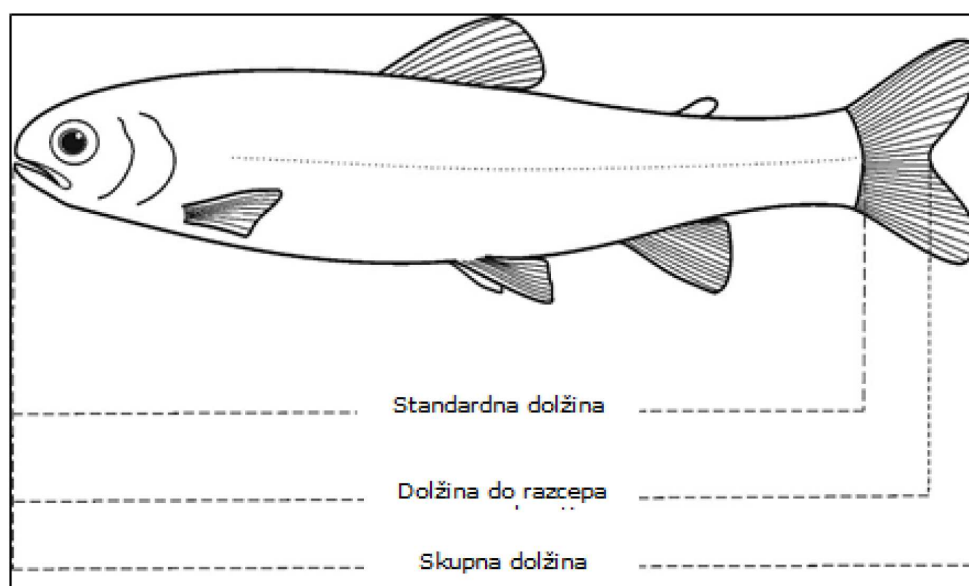
IACUC: odbor za varstvo in uporabo živali v laboratorijskih poskusih (Institutional Animal Care and Use Committee).

Standardna dolžina (SL): je dolžina ribe od konice nosu do posteriornega konca zadnjega hrbteničnega vretenca ali posteriornega konca osrednjega dela hipuralne plošče, kjer se konča hrbtenica. Ta meritev torej ne vključuje dolžine repne plavuti (www.fishbase.org).

Skupna dolžina (TL): je dolžina od konice nosu do skrajnega dela daljšega režnja repne plavuti in se običajno izmeri tako, da sta režnja stisnjena ob sredinski črti. To je meritev, ki se izvede v ravni črti in ne upošteva oblike telesa (www.fishbase.org).

Slika 1:

Opis različnih uporabljenih dolžin



EC_x: (učinkovita koncentracija za x-odstotni učinek) je koncentracija, ki v primerjavi s kontrolo povzroči x-odstotni učinek na preskusni organizem v danem obdobju izpostavljenosti. EC₅₀ je na primer koncentracija, pri kateri je ocenjeno, da bo imela v določenem obdobju izpostavljenosti učinek na končno točko preskusa pri 50 % izpostavljene populacije.

Pretočni preskus: preskus, pri katerem se preskusne raztopine med izpostavljenostjo neprekinjeno pretakajo skozi preskusni sistem.

Os HPG: os hipotalamus–hipofiza–spolne žleze.

IUPAC: Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo.

Stopnja obremenitve: mokra teža rib na prostornino vode.

Najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC): je najnižja preskušena koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri se opazi, da ima kemikalija statistično značilen učinek (pri $p < 0,05$) v primerjavi s kontrolo. Vendar bi morale imeti vse preskusne koncentracije nad vrednostjo LOEC škodljiv učinek, ki je enak ali večji od škodljivega učinka, opaženega pri vrednosti LOEC. Če teh dveh pogojev ni mogoče izpolniti, je treba podrobno pojasniti način izbire vrednosti LOEC (in posledično NOEC). Smernice so zajete v dodatkih 5 in 6.

Srednja smrtna koncentracija (LC50): je koncentracija preskusne kemikalije, za katero se oceni, da je med preskusom smrtonosna za 50 % preskusnih organizmov.

Koncentracija brez opaznega učinka (NOEC): je preskusna koncentracija takoj pod vrednostjo LOEC, ki v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega učinka ($p < 0,05$) v danem obdobju izpostavljenosti.

SMILES: sistem za poenostavljen zapis strukture molekul.

Gostota rib: število rib na prostornino vode.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

VTG: vitelogenin je fosfolipoglikoprotein in predstopnja beljakovin jajčnega rumenjaka, ki se običajno pojavi pri spolno aktivnih samicah vseh oviparnih vrst.

TPO: tedni po oploditvi.

Dodatek 2

NEKATERE KEMIJSKE LASTNOSTI SPREJEMLJIVE VODE ZA REDČENJE

Snov	Mejna koncentracija
delci	5 mg/l
skupni organski ogljik	2 mg/l
neionizirani amoniak	1 µg/l
preostali klor	10 µg/l
skupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	50 ng/l
skupni organski klor	25 ng/l
aluminij	1 µg/l
arzen	1 µg/l
krom	1 µg/l
kobalt	1 µg/l
baker	1 µg/l
železo	1 µg/l
svinec	1 µg/l
nikelj	1 µg/l
cink	1 µg/l
kadmij	100 ng/l
živo srebro	100 ng/l
srebro	100 ng/l

Dodatek 3

PRESKUSNI POGOJI ZA PRESKUS MEOGRT

1. Priporočena vrsta Japonska medaka (*Oryzias latipes*).
2. Vrsta preskusa Kontinuirani pretočni sistem.
3. Temperatura vode Nominalna temperatura pri preskusu je 25 °C. Srednja temperatura med celotnim preskusom v vsakem akvariju je od 24 do 26 °C.
4. Kakovost osvetlitve Fluorescenčne sijalke (široki spekter in ~ 150 lumnov/m²) (~ 150 luksov).
5. Obdobje osvetljenosti 16 ur svetlobe, 8 ur teme.
6. Stopnja obremenitve F0: 2 odrasla osebka/ponovljeni vzorec; F1: začne se z največ 20 ikrami (zarodki)/ponovljeni vzorec, pri izvalitvi se zmanjša na 12 zarodkov/ponovljeni vzorec, nato na dva odrasla osebka (XX-XY par za razmnoževanje) pri 9. do 10. tpo za fazo razmnoževanja.
7. Najmanjša uporabna prostornina preskusne komore 1,8 l (npr. velikost preskusne komore: 18 x 9 x 15 cm).
8. Izmenjave količine preskusnih raztopin Najmanj 5 izmenjav količine/dan do 16 izmenjav količine/dan (ali pretok 20 ml/min).
9. Starost preskusnih organizmov na začetku F0: > 12 tpo, vendar je priporočljivo, da ne več kot 16 tpo.
10. Število organizmov na ponovljeni vzorec F0: 2 ribi (par samca in samice); F1: največ 20 rib (iker)/ponovljeni vzorec (iz parov za razmnoževanje F0 in F1).
11. Število tretiranj 5 tretiranj s preskusno kemikalijo in ustrezne kontrole.
12. Število ponovljenih vzorcev na tretiranje Najmanj 6 ponovljenih vzorcev na tretiranje za preskusno kemikalijo in najmanj 12 ponovljenih vzorcev za kontrolo ter za kontrolo s topilom, če se uporabi (število ponovljenih vzorcev je podvojeno v fazi razmnoževanja v F1).
13. Število organizmov na preskus Najmanj 84 rib v F0 in 504 v F1. (Če se uporabi kontrola s topilom, potem 108 rib v F0 in 648 v F1.) Enota, ki se šteje, je zarodek v fazi brez mešička.
14. Način hranjenja Ribe se hranijo s solinskimi rakci vrste *Artemia* (24 ur starimi navpliji) *ad libitum*, ki se lahko po potrebi dopolnijo s hrano v kosmičih, ki je na voljo na trgu (primer načrta hranjenja za zagotovitev ustrezne rasti in razvoja, da se podpre zanesljivo razmnoževanje, je naveden v Dodatku 5).
15. Prezračevanje Brez prezračevanja, razen če se raztopljeni kisik približa < 60 % vrednosti nasičenosti z zrakom.
16. Voda za redčenje Čista površinska voda, voda iz vodnjaka ali modelna razredčevalna voda ali deklorirana vodovodna voda.

17. Obdobje izpostavljenosti V glavnem 19 tednov (od F0 do izvalitve F2).
18. Biološke končne točke (primarne) Valilnost (F1 in F2); preživetje (F1, od izvalitve do 4. tpo (konec obdobja ličinke/začetek obdobja mladice), od 4. do 9. (ali 10.) tpo (začetek obdobja mladice do obdobja mladostnega osebka) in od 9. do 15. tpo (obdobje mladostnega osebka do konca odraslega osebka)); rast (F1, dolžina in teža pri 9 in 15 tpo); sekundarne spolne značilnosti (F1, papile na predrepni plavuti pri 9 in 15 tpo); vitelogenin (F1, mRNK vtg ali protein VTG pri 15 tpo); fenotipski spol (F1, na podlagi histologije spolnih žlez pri 15 tpo); razmnoževanje (F0 in F1, plodnost in fertilnost za 21 dni); čas do drstenja (F1) in histopatologija (F1, spolne žleze, jetra in ledvice pri 15 tpo).
19. Merila za veljavnost preskusa Raztopljeni kisik ≥ 60 % vrednosti nasičenosti z zrakom; srednja temperatura vode od 24 do 26 °C med celotnim preskusom; uspešno razmnoževanje ≥ 65 % samic v kontrolah; srednja dnevna plodnost ≥ 20 iker v kontrolah; valilnost ≥ 80 -odstotna (povprečno) v kontrolah (v vsaki od generacij F1 in F2); preživetje po izvalitvi do 3. tpo ≥ 80 -odstotna (povprečno) in od 3. tpo do konca za generacijo ≥ 90 -odstotna (povprečno) v kontrolah (F1), koncentracije preskusne kemikalije v raztopini je treba zadovoljivo vzdrževati v okviru ± 20 % srednjih izmerjenih vrednosti.

Dodatek 4

SMERNICE O OBIČAJNIH KONTROLNIH VREDNOSTIH

Navesti je treba, da te kontrolne vrednosti temeljijo na omejenem številu validacijskih študij in se lahko spremenijo na podlagi nadaljnjih izkušenj.

Rast

Teža in dolžina se pri vseh vzorčenih ribah izmerita pri 9 ali (10) in 15 tednih po oploditvi (tpo). Z upoštevanjem tega protokola bo pričakovana mokra teža pri 9 tpo 85–145 mg za samce in 95–150 mg za samice. Pričakovana teža pri 15 tpo je 250–330 mg za samce in 280–350 mg za samice. Čeprav lahko pri posameznih ribah obstajajo precejšnja odstopanja od teh vrednosti, kontrolne srednje teže, ki bistveno odstopajo od teh razponov, zlasti nižje, kažejo na težave s hranjenjem, nadzorom temperature, kakovostjo vode, bolezen ali kombinacijo teh dejavnikov.

Izvalitev

Uspešnost izvalitve v kontrolah je običajno približno 90-odstotna, vendar tudi tako nizke vrednosti, kot je 80 %, niso neobičajne. Manj kot 75-odstotna uspešnost izvalitve lahko kaže na nezadostno mešanje razvijajočih se iker ali nezadostno skrb pri ravnanju z njimi, kot je nepravočasna odstranitev odmrlih iker, zaradi česar se lahko razvijejo glivične okužbe.

Preživetje

Stopnje preživetja do 3. tpo od izvalitve in po 3. tpo so običajno 90-odstotne ali višje pri kontrolah, vendar tudi tako nizke stopnje preživetja v zgodnjih življenjskih fazah, kot je 80 %, niso skrb vzbujajoče. Manj kot 80-odstotne stopnje preživetja v kontrolah so vzrok za zaskrbljenost in lahko kažejo na nezadostno čiščenje akvarija, ki vodi do izgube larvalnih rib zaradi bolezni ali zadušitve zaradi nizkih ravni raztopljenega kisika. Vzrok za pogine so lahko tudi poškodbe med čiščenjem bazena in izguba larvalnih rib prek sistema odtekanja vode iz akvarija.

Gen vitelogenin

Čeprav se lahko absolutne ravni gena *vitelogenin* (*vtg*), izraženega kot kopije/ng celokupne mRNK, med laboratoriji zelo razlikujejo zaradi uporabljenih postopkov ali instrumentov, mora biti delež *vtg* pri kontrolnih samicah približno 200-krat večji kot pri kontrolnih samcih. Nič neobičajnega ni, če to razmerje sega celo od 1 000 do 2 000, vendar pa so razmerja, manjša od 200, sumljiva in lahko kažejo na težave z okužbo vzorca ali težave z uporabljenim postopkom in/ali reagenti.

Sekundarne spolne značilnosti

Pri samcih je običajni razpon sekundarnih spolnih značilnosti, opredeljen kot skupno število segmentov papil na plavutnicah predrepne plavuti, od 40 do 80 segmentov pri 9 do 10 tpo. Pri 15 tpo mora biti razpon pri kontrolnih samcih približno od 80 do 120 in 0 pri kontrolnih samicah. Iz nepojasnenih razlogov nekateri samci v redkih primerih do 9. tpo nimajo prisotnih papil, ker pa vsi kontrolni samci razvijejo papile do 15. tpo, je vzrok za to verjetno zapoznel razvoj. Prisotnost papil pri kontrolnih samicah kaže na prisotnost XX-samcev v populaciji.

XX-samci

Običajna pojavnost XX-samcev v kulturi se zdi približno 4-odstotna ali nižja pri 25 °C, pri čemer se pojavnost zvišuje z zviševanjem temperature. Sprejeti je treba ukrepe za zmanjšanje deleža XX-samcev v populaciji. Ker se zdi, da je pojavnost XX-samcev genetsko pogojena in torej dedna, je spremljanje staleža, ki se goji, in zagotavljanje, da se XX-samci ne uporabijo za razmnoževanje staleža, učinkovito sredstvo za zmanjšanje njihove pojavnosti v populaciji.

Drstenje

Drstenje v kontrolnih ponovljenih vzorcih je treba pred oceno plodnosti spremljati dnevno. Pri kontrolnih parih se lahko znaki drstenja ocenijo kvalitativno vizualno. Pri 12 do 14 tpo bi se morala drstiti večina kontrolnih parov. Majhno število drstečih se parov ob tem času kaže na morebitne težave z zdravjem, zrelostjo ali dobrim počutjem rib.

Plodnost

Zdrave in dobro hranjene medake pri 12 do 14 tpo se običajno drstijo vsak dan in proizvedejo od 15 do 50 iker na dan. 16 od priporočenih 24 kontrolnih parov za razmnoževanje (> 65 %) mora proizvesti več kot 20 iker na par na dan, lahko pa jih celo 40. Manjše število lahko kaže na nezrele, slabo hranjene ali nezdrave drsteče se pare.

Fertilnost

Delež fertilnih iker pri kontrolnih drstečih se parih je običajno v območju 90 %, pri čemer vrednosti, ki znašajo od 95 do 99 %, niso neobičajne. Manj kot 80-odstotne stopnje fertilnosti pri kontrolnih ikrah so sumljive in lahko kažejo na nezdrave osebkke ali pogoje gojenja, ki niso idealni.

Dodatek 5

PRIMER NAČRTA HRANJENJA

V preglednici 1 je prikazan primer načrta hranjenja za zagotovitev ustrezne rasti in razvoja, da se podpre zanesljivo razmnoževanje. Odstopanja od tega načrta hranjenja so sprejemljiva, vendar jih je priporočljivo preskusiti, da se preveri upoštevanje sprejemljive rasti in razmnoževanja. Da bi se upošteval predlagani načrt hranjenja, je treba pred začetkom preskusa določiti suho težo solinskih rakcev na količino kaše iz solinskih rakcev. To se lahko stori s tehtanjem opredeljene količine kaše iz solinskih rakcev, ki se je 24 ur sušila pri 60 °C na predhodno stehtanih posodah. Da bi se upoštevala masa soli v kaši, je treba posušiti tudi enako količino enake raztopine soli, uporabljene v kaši, jo stehtati in odšteti od teže posušene kaše iz solinskih rakcev. Alternativno se lahko solinski rakci pred sušenjem prefiltrirajo in sperejo z destilirano vodo, s čimer se odpravi potreba po merjenju mase „soli v kaši“. Ta podatek se uporabi za pretvorbo podatka v preglednici iz suhe teže solinskih rakcev v količino kaše iz solinskih rakcev, ki jo je treba dati ribam. Poleg tega je priporočljivo tedensko tehtati alikvote kaše iz solinskih rakcev in s tem preveriti, da se ribam daje pravilna suha teža solinskih rakcev.

Preglednica 1

Primer načrta hranjenja

Čas (po izvalitvi)	Solinski rakci (mg suhe teže/ribo/dan)
1. dan	0,5
2. dan	0,5
3. dan	0,6
4. dan	0,7
5. dan	0,8
6. dan	1,0
7. dan	1,3
8. dan	1,7
9. dan	2,2
10. dan	2,8
11. dan	3,5
12. dan	4,2
13. dan	4,5

Čas (po izvalitvi)	Solinski rakci (mg suhe teže/ribo/dan)
14. dan	4,8
15. dan	5,2
16.–21. dan	5,6
4. teden	7,7
5. teden	9,0
6. teden	11,0
7. teden	13,5
8. teden–usmrtitev	22,5

Dodatek 6

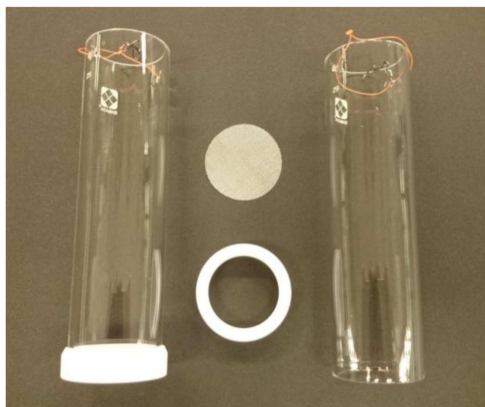
PRIMERA INKUBACIJSKE KOMORE ZA IKRE

Primer A



Ta inkubator je sestavljen iz prečno prerezane steklene centrifugirke, ki je povezana z ovojem iz nerjavnega jekla, na mesto pa je pritrjena z vijačno kapico. Iz kapice moli majhna steklena cevka ali cevka iz nerjavnega jekla, ki je nameščena blizu ukrivljenega dna in nežno meša zrak, da so ikre suspendirane in da se zmanjša prenos saprofitskih glivičnih okužb med njimi, obenem pa omogoča tudi izmenjavo kemikalije med inkubatorjem in zadrževalnim akvarijem.

Primer B





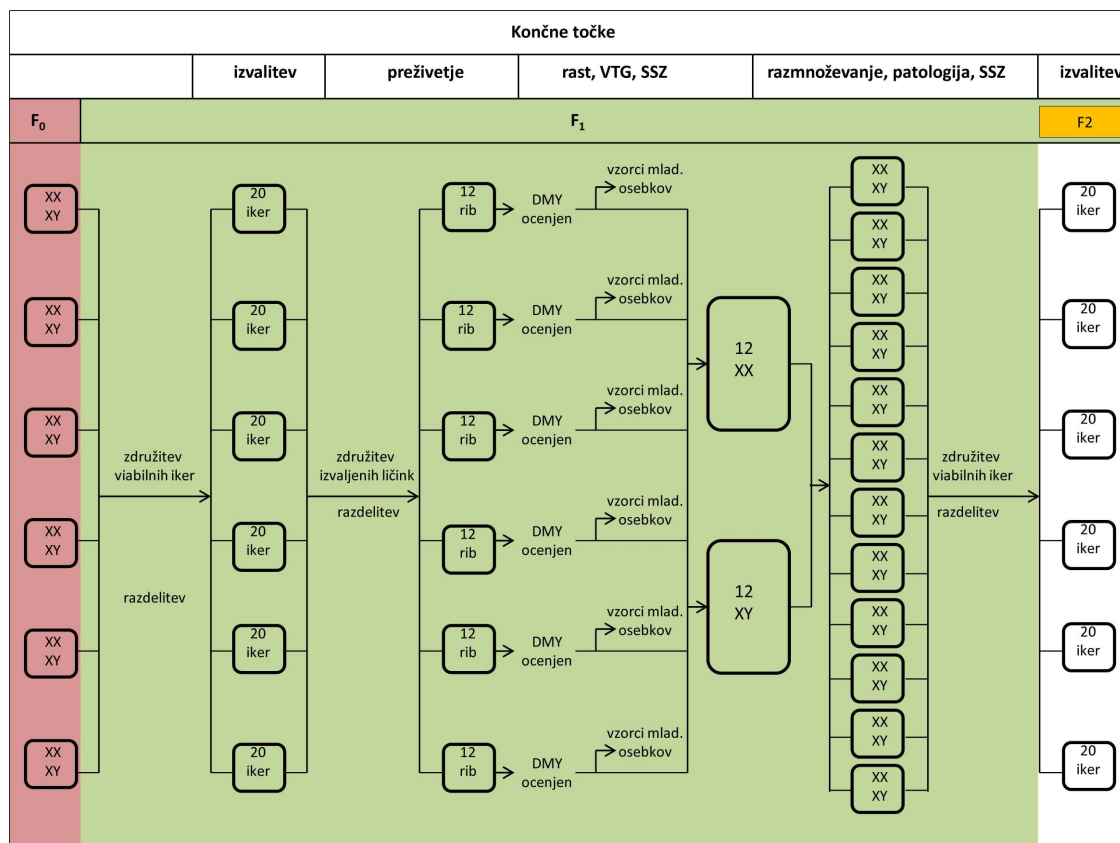
Ta inkubator je sestavljen iz steklenega valjastega telesa (premer 5 cm, višina 10 cm) in nerjavne žičnate mrežice (0,25 ϕ in 32 mesh), ki je pritrjena na dno telesa s PTFE-obročkom. Inkubatorji so spuščeni z dvizhne prečke v akvarije in se vertikalno stresajo (amplituda približno 5 cm) v ustreznem ciklu (približno vsake 4 sekunde) za ikre medake.

Dodatek 7

SHEMATSKI DIAGRAM ZA ZDRUŽEVANJE IN VKLJUČEVANJE OSEBKOV V PONOVLJENE VZORCE SKOZI CELOTNO PRESKUSNO METODO MEOGRT

Slika 1

Združevanje in vključevanje osebkov v ponovljene vzorce v preskusu MEOGRT. Slika prikazuje eno tretiranje ali 1/2 kontrole. Zaradi združevanja identiteta ponovljenega vzorca ni stalna skozi celoten preskus. Upoštevajte, da se izraz „ikre“ nanaša na viabilne, oplojene ikre (enakovredne zarodkom).



Tretiranja in ponovitve

V tej preskusni metodi se priporoča pet tretiranj s preskusno kemikalijo z uporabo materiala ustrezne tehnične kakovosti in negativna kontrola. Število ponovljenih vzorcev na tretiranje ne ostane konstantno med celotnim preskusom MEOGRT, število ponovljenih vzorcev v kontrolnem tretiranju pa je dvakratnik vsakega posameznega tretiranja s preskusno kemikalijo. V generaciji F₀ je pri vsakem tretiranju s preskusno kemikalijo šest ponovljenih vzorcev, medtem ko je pri negativni kontroli 12 ponovljenih vzorcev. Topila so močno odsvetovana, če pa se uporabijo, je treba v poročilo o preskusu MEOGRT vključiti utemeljitev tako za uporabo topila kot tudi za izbiro topila. Če se uporabi topilo, sta poleg tega potrebni dve vrsti kontrol: (a) kontrola s topilom in (b) negativna kontrola. Vsaka od teh dveh kontrolnih skupin mora vsebovati celoten niz ponovljenih vzorcev na vseh točkah časovnega okvira preskusa MEOGRT. Ta struktura ponovljenih vzorcev ostane enaka ves čas razvoja preskusnega organizma v generaciji F₁ (in F₂ do izvalitve). Vendar pa se v fazi odraslih rib, ko se vzpostavijo pari za razmnoževanje generacije F₁, število ponovljenih vzorcev s pari za razmnoževanje na tretiranje v optimalnem primeru podvoji; obstaja torej do 12 ponovitev parov v vsakem tretiranju s preskusno kemikalijo in 24 ponovitev parov v kontrolni skupini (in po potrebi še 24 ponovitev parov v kontroli s topilom). Določitev izvalitve iz zarodkov, ki so jih odložili pari F₁, se opravi na podlagi enake ponovitvene strukture, kot je bila uporabljena za zarodke, ki so jih odložili pari F₀, kar pomeni šest ponovljenih vzorcev na tretiranje s preskusno kemikalijo in 12 ponovljenih vzorcev v kontrolnih skupinah.

Dodatek 8

ŠTETJE PAPIL NA PREDREPNI PLAVUTI

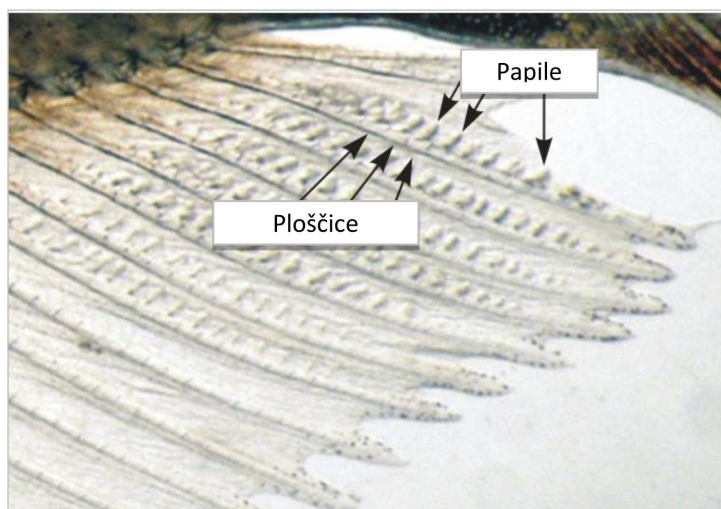
Glavni materiali in reagenti

- Stereomikroskop (z neobvezno kamero)
- Fiksativ (npr. Davidsonov (Bouinov ni priporočen)), če se papile ne štejejo po sliki

Postopki

Po obdukciji je treba predrepno plavut slikati, da se omogoči ustrezno štetje papil na predrepni plavuti. Čeprav je slikanje priporočena metoda, se lahko predrepna plavut približno 1 minuto fiksira z Davidsonovim ali drugim ustreznim fiksativom. Pomembno je, da je predrepna plavut med fiksiranjem ravna, da se omogoči lažje štetje papil. Trup s predrepno plavutjo se lahko do analize shrani v Davidsonovem ali drugem ustreznem fiksativu. Preštete število ploščic (glej **slika 1**) s papilami, ki štrlijo iz posteriornega roba ploščice.

Slika 1

Papile na predrepni plavuti

Dodatek 9

PODROBEN ČASOVNI OKVIR PRESKUSA MEOGRT

1. do 3. teden preskusa (F0)

Drsteče se ribe generacije F0, ki izpolnjujejo merila za izbiro (glej odstavke od 16 do 20), so izpostavljene tri tedne, da bi bile lahko razvijajoče se gamete in tkivo spolnih žlez izpostavljeni preskusni kemikaliji. Vsak ponovitveni akvarij vključuje en sam par rib za razmnoževanje (par za razmnoževanje XX-samica in XY-samec). Odložene ike se odvezemajo, štejejo in ocenjujejo glede fertilitnosti 21 zaporednih dni, začeni s 1. dnem preskusa.

4. teden preskusa (F0 in F1)

Zaželeno je, da se oplojene in viabilne ike (zarodki) odvzamejo na isti dan; če zarodkov ni dovolj, pa se lahko odvzamejo v dveh dneh. Če se odvzamejo v dveh dneh, se vsi zarodki v okviru tretiranja, ki so bili odvzeti prvi dan, združijo z zarodki, odvzetimi drugi dan. Nato se vsi združeni zarodki za vsako tretiranje naključno razdelijo v vse ponovitvene inkubatorje, in sicer po 20 zarodkov na inkubator. Vsak dan se preverja in evidentira smrtnost oplojenih iker (zarodkov). Odmrle ike se odstranijo iz inkubatorjev (odmrle ike je mogoče zlasti v zgodnjih stopnjah prepoznati po opazni izgubi prosojnosti in spremembi barve, ki jo povzroči koagulacija in/ali obarjanje beljakovin, ki povzročajo bel moten videz; OECD 2010).

Opomba: Če je drugi dan odvzema potreben za eno samo tretiranje, morajo temu postopku slediti vsa tretiranja (vključno s kontrolami). Če po drugem dnevu odvzema ni dovolj zarodkov v okviru tretiranja, da bi se v inkubatorje vložilo po 20 zarodkov, zmanjšajte število zarodkov, vloženih v okviru tega določenega tretiranja, na 15 zarodkov na inkubator. Če ni dovolj zarodkov za vložitev 15 zarodkov na inkubator, zmanjšajte število ponovitvenih inkubatorjev, tako da bo dovolj zarodkov za 15 zarodkov na inkubator. Poleg tega se lahko v F0 doda več parov za razmnoževanje na tretiranje in kontrole, da se proizvede več iker za doseg priporočenih 20 zarodkov na ponovljeni vzorec.

Na 24. dan preskusa se pari za razmnoževanje generacije F0 humano usmrtijo, pri čemer se evidentirata teža in dolžina. Po potrebi se lahko pari za razmnoževanje generacije F0 ohranijo še en ali dva dni, da se znova začne generacija F1.

5. in 6. teden preskusa (F1)

En do dva dneva pred predvidenim začetkom izvalitve ustavite ali zmanjšajte mešanje iker v inkubatorju, da pospešite izvalitev. Ker se zarodki valijo vsak dan, se izvaljene ličinke združijo po tretiranjih in sistematično razdelijo v vsak ponovitveni akvarij za ličinke v okviru določenega tretiranja, ki ne vsebuje več kot 12 izvaljenih ličink. To se stori tako, da se izvaljene ličinke naključno izberejo in nato nediskriminatorno zaporedoma vključijo v ponovljene vzorce ter tako po vrsti prek ponovljenih vzorcev določenega tretiranja, dokler ni v vseh ponovljenih vzorcih v okviru tretiranja 12 izvaljenih ličink. Če ni dovolj izvaljenih ličink, da bi zapolnili vse ponovljene vzorce, je treba zagotoviti, da ima čim več ponovljenih vzorcev 12 izvaljenih ličink, da se začne faza F1.

Ike, ki se niso izvalile do dvakratnika srednjega kontrolnega dne izvalitve, se štejejo za neviabilne in se zavržejo. Število izvaljenih ličink se evidentira in izračuna se uspešnost izvalitve (valilnost) v vsakem ponovljenem vzorcu.

7. do 11. teden preskusa (F1)

Vsak dan se preverja in evidentira preživetje larvalnih rib v vseh ponovljenih vzorcih. Na 43. dan preskusa se evidentirata število preživelih rib v vsakem ponovljenem vzorcu in tudi začetno število izvaljenih ličink, vstavljenih v ponovljeni vzorec (nominalno 12). To omogoča izračun stopnje preživetja od izvalitve do faze mladostnega osebk.

12. teden preskusa (F1)

Na 78.–85. dan preskusa se z repne plavuti vsake ribe odvzame majhen vzorec tkiva za določitev genotipskega spola osebka (tj. odščip plavuti) pri vseh ribah. Ta podatek se uporabi za vzpostavitev parov za razmnoževanje.

V treh dneh po določitvi genotipskega spola vsake ribe se naključno vzpostavi 12 parov za razmnoževanje na tretiranje in 24 parov na kontrolo. Iz vsakega ponovljenega vzorca se naključno izbereta po dve ribi XX in XY, ki se nato združijo po spolu, ter nato naključno izberejo za vzpostavitev para za razmnoževanje (tj. par XX-XY). Vzpostavi se najmanj 12 ponovljenih vzorcev na tretiranje s kemikalijo in najmanj 24 ponovljenih vzorcev za kontrolo z enim parom za razmnoževanje na ponovljeni vzorec. Če v ponovljenem vzorcu ni bodisi dveh rib XX bodisi dveh rib XY, ki so na voljo za združevanje, je treba ribe z ustreznim genotipskim spolom pridobiti iz drugih ponovljenih vzorcev v okviru tretiranja.

Preostale ribe (največ 8 rib na ponovljeni vzorec) se humano usmrtijo in vzorčijo za različne končne točke pri mladostnih osebkih. Podatki o *dmy* (XX ali XY) za vse vzorce mladostnih osebkov se ohranijo za zagotovitev, da je mogoče vse podatke o končnih točkah povezati z genetskim spolom vsake posamezne ribe.

13. in 14. teden preskusa (F1)

Izpostavljenost se nadaljuje, ko se pari mladostnih osebkov za razmnoževanje razvijajo v odrasle ribe. Na 98. dan preskusa (tj. dan pred začetkom odvzema iker) se ikre odstranijo iz akvarijev in s samic.

15. do 17. teden preskusa (F1)

Odložene ikre se odvijajo dnevno 21 zaporednih dni v vsakem ponovljenem vzorcu, ocenita se plodnost in fertilitnost.

18. teden preskusa (ponovitev 4. tedna preskusa) (F1 in F2)

Na 120. dan preskusa se zjutraj odvzamejo ikre v vsakem ponovljenem akvariju. Odvzete ikre se ocenijo, oplojene ikre (z odstranjenimi filamenti) vsakega od parov za razmnoževanje pa se združijo po tretiranjih in sistematično razdelijo v inkubacijske komore za ikre z 20 oplojenimi ikrami na inkubator. Inkubatorji se lahko postavijo v ločene „inkubacijske akvarije“, vzpostavljene za vsako tretiranje, ali v ponovljeni akvarij, ki bo po izvalitvi vseboval izvaljene ličinke. Zaželeno je, da se zarodki odvzamejo na isti dan; če pa jih ni dovolj, se lahko odvzamejo v dveh dneh. Če se odvzamejo v dveh dneh, se vsi zarodki v okviru tretiranja, ki so bili odvzeti prvi dan, združijo z zarodki, odvzetimi drugi dan. Nato se vsi združeni zarodki za vsako tretiranje naključno razdelijo v vse ponovitvene inkubatorje, in sicer po 20 zarodkov na inkubator. Opomba: če je drugi dan odvzema potreben za eno samo tretiranje, morajo temu postopku slediti vsa tretiranja (vključno s kontrolami). Če po drugem dnevu odvzema ni dovolj zarodkov v okviru tretiranja, da bi se v inkubatorje vložilo po 20 zarodkov, zmanjšajte število zarodkov, vloženih v okviru tega določenega tretiranja, na 15 zarodkov na inkubator. Če ni dovolj zarodkov za vložitev 15 zarodkov na inkubator, zmanjšajte število ponovitvenih inkubatorjev, tako da bo dovolj zarodkov za 15 zarodkov na inkubator.

Na 121. dan preskusa (ali 122. dan preskusa, da se zagotovi dober začetek generacije) se pari za razmnoževanje generacije F1 humano usmrtijo in analizirajo za končne točke pri odraslih ribah. Po potrebi se lahko pari za razmnoževanje generacije F1 ohranijo še en ali dva dni, da se znova začne generacija F2.

19. in 20. teden preskusa (F2)

En do dva dneva pred predvidenim začetkom izvalitve ustavite ali zmanjšajte mešanje iker v inkubatorju, da pospešite izvalitev. Če se preskus konča z dokončno izvalitvijo generacije F2, se izvaljene ličinke vsak dan evidentirajo in zavržejo. (Zarodki, ki se niso izvalili po podaljšanem času inkubacije, opredeljenem kot dvakratnik srednjega kontrolnega dne izvalitve, se štejejo za neviabilne.)

Dodatek 10

STATISTIČNA ANALIZA

Vrste bioloških podatkov, pridobljenih s preskusom MEOGRT, niso edinstvene zanj, tako da so bile razen za podatke o patologiji razvite številne ustrezne statistične metodologije za pravilno analizo podobnih podatkov, odvisne od značilnosti podatkov, vključno z normalnostjo, homogenostjo variance, s tem, ali načrt študije omogoča preskušanje predpostavk ali regresijsko analizo, parametrske in neparametrske preskusi itd. Na splošno predlagane statistične analize sledijo priporočilom OECD za podatke o ekotoksičnosti (OECD 2006), diagram poteka odločanja za analizo podatkov preskusa MEOGRT pa je prikazan v preglednici 2.

Predvideva se, da bodo podatkovni nizi najpogosteje prikazali monotone odzive. Poleg tega je treba razmisliti o vprašanju uporabe enostranskega statističnega testa v primerjavi z dvostranskim statističnim testom. Razen če obstajajo biološki razlogi, zaradi katerih enostranski test ne bi bil primeren, se predlaga uporaba enostranskih testov. Čeprav so v naslednjem oddelku priporočeni nekateri statistični testi, bodo, če bodo za uporabo za specifične podatke, pridobljene s preskusom MEOGRT, razvite ustreznejše in/ali močnejše statistične metode, ti statistični testi uporabljeni za okrepitev teh prednosti.

Podatke preskusa MEOGRT je treba analizirati ločeno za vsak genotipski spol. Obstajata dve strategiji za analizo podatkov o ribah z zamenjanim spolom (bodisi XX-samci bodisi XY-samice). (1) Izločite vse podatke o ribah z zamenjanim spolom v celotnem preskusu, razen prevalence zamenjave spola v vsakem ponovljenem vzorcu. (2) Pustite podatke o vseh ribah z zamenjanim spolom v podatkovnem nizu in analizo opravite na podlagi genotipa.

Histopatološki podatki

Histopatološki podatki se navedejo kot ocene resnosti, ki se določijo z novorazvitim statističnim postopkom, tj. Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS), (Green *et al.*, 2014). Pri Rao-Scottovi prilagoditvi se upoštevajo informacije o ponovitvah v preskusu; postopek by Slices vključuje biološko pričakovanje, da se ocene resnosti običajno zvišajo z zvišanjem koncentracij tretiranja. Za vsako diagnozo rezultat RSCABS opredeljuje, v katerih tretiranjih je prevalenca patologije višja kot v kontrolah, in s tem določa povezano stopnjo resnosti.

Podatki o plodnosti

Analize za podatke o plodnosti vključujejo regresijski test po Jonckheere-Terpstraju ali Williamsov test za določitev učinkov tretiranja, če so podatki skladni z monotonim odzivom na koncentracijo. Pri regresijskem testu se vse primerjave opravijo na ravni značilnosti 0,05, prilagoditev za število opravljenih primerjav pa se ne izvede. Za podatke se pričakuje, da so skladni z monotonim odzivom na koncentracijo, vendar pa je to mogoče preveriti bodisi z vizualnim pregledom podatkov bodisi z oblikovanjem linearnih in kvadratnih kontrastov srednjih vrednosti tretiranj po pretvorbi porazdelitve podatkov. Razen če je kvadratni kontrast statistično značilen, linearni kontrast pa ne, se izvede trendni test. Sicer se za določitev učinkov tretiranja uporabi Dunnettov test, če so podatki normalno porazdeljeni s homogenostjo varianc. Če te zahteve niso izpolnjene, se uporabi Dunnov test z Bonferroni-Holmovo prilagoditvijo. Vsi navedeni testi se izvedejo neodvisno od kakršnega koli celovitega F-testa ali Kruskal-Wallisovega testa. Več podrobnosti o tem je v OECD 2006.

Uporabijo se lahko alternativne metode, kot je posplošeni linearni model s Poissonovimi napakami za štetje iker (brez pretvorbe), če so statistično utemeljene (Cameron in Trividi, 2013). Če se uporabi alternativni pristop, se priporoča statistično svetovanje.

Dnevno štetje iker v eni generaciji

Model analize variance ANOVA je podan z enačbo $Y = \text{čas} \cdot \text{čas} + \text{tretiranje} + * \text{tretiranje} + \text{čas} \cdot \text{tretiranje} + * \text{čas} \cdot \text{tretiranje}$ z naključnimi učinki ponovljenega vzorca (generacija * tretiranje), in čas * ponovljeni vzorec (tretiranje), ki dopušča neenake komponente variance obeh vrst po generacijah. Tukaj se čas nanaša na pogostost štetja iker (npr. na dan ali teden). To je analiza ponovljenih meritev s korelacijami med opaznanji pri enakih ponovljenih vzorcih, ki predstavljajo naravo ponovljenih meritev podatkov.

Glavni učinki tretiranja se preskusijo z Dunnettovim (ali Dunnettovim in Hsujevim) testom, pri katerem se opravi prilagoditev za število primerjav. Potrebni sta prilagoditvi za glavni učinek generacije ali časa, saj pri teh dveh dejavnikih ni „kontrolne“ ravni in je vsak par ravni primerjava, ki bi lahko bila zanimiva. Če je za ta dva glavna učinka F-test za glavni učinek statistično značilen na ravni 0,05, potem se lahko parne primerjave po ravneh navedenega faktorja preskusijo na ravni 0,05 brez nadaljnje prilagoditve.

Model vključuje interakcije dveh in treh faktorjev, tako da glavni učinek za, na primer, čas, morda ne bo statistično značilen, čeprav ima čas pomemben učinek na rezultate. Če je torej interakcija dveh ali treh faktorjev, med katerimi je čas, statistično značilna na ravni 0,05, potem se lahko sprejmejo primerjave ravni časa na ravni značilnosti 0,05 brez nadaljnje prilagoditve.

Naslednji so F-testi za statistično značilnost tretiranja v okviru časa, tako imenovana območja v preglednici ANOVA. Če je na primer območje za tretiranje v okviru F1 in časa 12 statistično značilno na ravni 0,05, potem se lahko sprejmejo parne primerjave za tretiranje v okviru F1 in časa 12 na ravni 0,05 brez nadaljnje prilagoditve. Enake izjave veljajo za teste za čas v okviru F1 in tretiranja ter za generacijo v okviru časa in tretiranja.

Nazadnje, za primerjave, ki ne spadajo pod nobeno od navedenih kategorij, je treba primerjave prilagoditi z uporabo Bonferroni-Holmove prilagoditve za p-vrednosti. Dodatne informacije o analizah takih modelov je mogoče najti v Hocking (1985) ter Hochberg in Tamhane (1987).

Alternativno se evidentirajo neobdelani podatki, ki se v poročilu o študiji predstavijo kot plodnost (število iker) na ponovljeni vzorec za vsak dan. Izračunati je treba srednjo vrednost neobdelanih podatkov ponovljenega vzorca in nato uporabiti transformacijo s kvadratnim korenom. Izračunati je treba enofaktorsko analizo variance ANOVA za transformirane srednje vrednosti ponovljenega vzorca, ki ji sledijo Dunnettovi kontrasti. Morda bo koristno tudi, da se vizualno pregledajo podatki o plodnosti za vsako tretiranje in/ali ponovljeni vzorec z razsevnim grafikonom, ki prikazuje podatke skozi čas. To bo omogočilo neformalno oceno morebitnih učinkov skozi čas.

Vsi drugi biološki podatki

Statistične analize temeljijo na osnovni predpostavki, da bodo z izbiro pravilnega odmerka podatki monotoni. Za podatke se torej predpostavlja, da so monotoni, pri čemer se monotonost formalno oceni z uporabo linearnih in kvadratnih kontrastov. Če so podatki monotoni, se priporoča trendni test za mediane ponovljenih vzorcev po Jonckheere-Terpstraju (kot je priporočen v OECD 2006). Če je kvadratni kontrast statistično značilen, linearni kontrast pa ne, se šteje, da podatki niso monotoni.

Če podatki niso monotoni, zlasti zaradi zmanjšane odziva enega ali dveh najbolj obremenjenih tretiranj, je treba razmisliti o cenzuriranju podatkovnega niza, tako da se analiza opravi brez navedenih tretiranj. To odločitev bo treba sprejeti na podlagi strokovne presoje in vseh razpoložljivih podatkov, zlasti podatkov, ki kažejo očitno toksičnost na navedenih ravneh tretiranja.

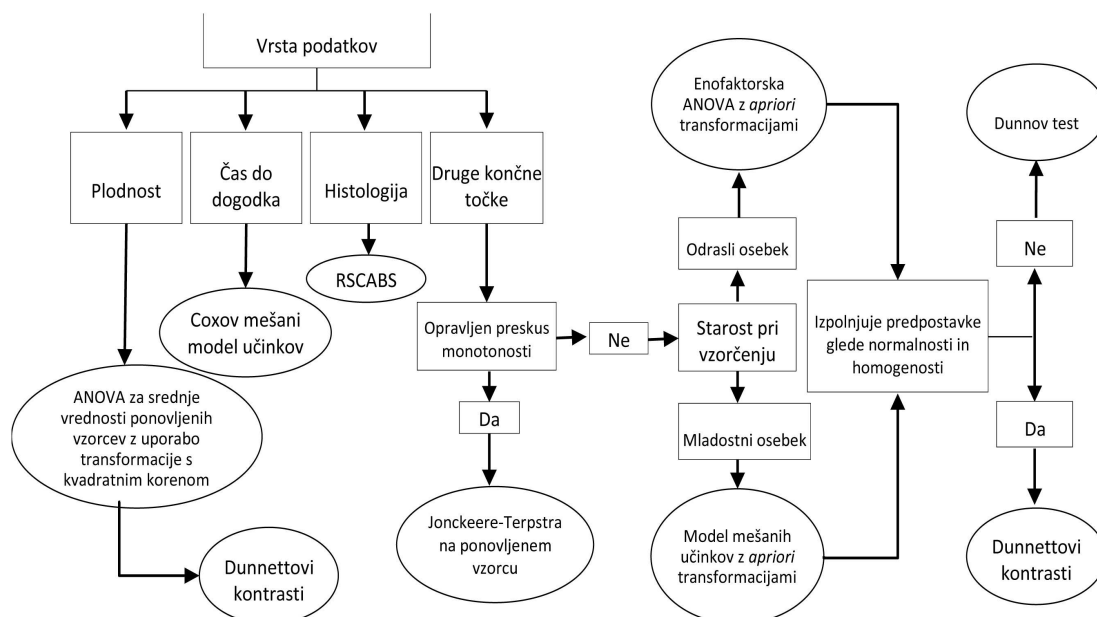
Za težo in dolžino se transformacije ne priporočajo, čeprav bodo občasno morda potrebne. Vendar pa se za podatke o vitelogeninu priporoča logaritemska transformacija; za podatke o SSZ (papile na predrepni plavuti) se priporoča kvadratnokorenska transformacija; arkus-sinus-kvadratnokorenska transformacija se priporoča za podatke o deležu izvalitve, stopnji preživetja, razmerju med spoloma in deležu fertilnih iker. Čas do izvalitve in čas do prvega drstenja je treba obravnavati kot podatke o času do dogodka, pri čemer se posamezni zarodki, ki se ne izvalijo v opredeljenem obdobju, ali ponovljeni vzorci, ki se nikoli ne drstijo, obravnavajo kot desno cenzurirani podatki. Čas do izvalitve je treba izračunati od srednjega dne izvalitve vsakega ponovljenega vzorca. Te končne točke je treba analizirati z uporabo mešanega Coxovega modela sorazmernih tveganj.

Biološki podatki iz vzorcev odraslih rib imajo eno meritev na ponovljeni vzorec, tj. obstaja ena XX- in ena XY-riba na ponovitveni akvarij. Zato je priporočljivo, da se za srednje vrednosti ponovljenega vzorca izvede enofaktorska ANOVA. Če sta predpostavki analize ANOVA (normalnost in homogenost variance, kot sta ocenjeni pri ostankih iz analize ANOVA s Shapiro-Wilkovim testom oziroma Levenovim testom) izpolnjeni, je treba uporabiti Dunnettove kontraste za določitev tretiranj, ki so se razlikovala od kontrole. Če pa predpostavki analize ANOVA nista izpolnjeni, je treba opraviti Dunnov test za določitev, katera tretiranja so se razlikovala od kontrole. Podoben postopek se priporoča za podatke, ki so v obliki odstotkov (plodnost, izvalitev in preživetje).

Biološki podatki iz vzorcev mladostnih osebkov imajo od 1 do 8 meritev na ponovljeni vzorec, tj. lahko obstaja spremenljivo število osebkov, ki prispevajo k srednji vrednosti ponovljenih vzorcev za vsak genotipski spol. Zato se priporoča uporaba mešanega modela ANOVA in nato Dunnettovih kontrastov, če sta bili predpostavki glede normalnosti in homogenosti variance izpolnjeni (pri ostankih iz mešane analize ANOVA). Če nista bili izpolnjeni, je potreben Dunnov test za določitev, katera tretiranja so se razlikovala od kontrole.

Slika 2

Diagram poteka za priporočene statistične postopke za analizo podatkov preskusa MEOGRT



VIRI

- (1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Pariz.
- (2) Cameron, A. C., in Trivedi, P. K. (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.
- (3) Hocking, R. R. (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg, Y., in Tamhane, A. C. (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 PRESKUS RASTI IN RAZVOJA LIČINK DVOŽIVK (LAGDA)**UVOD**

1. Ta preskusna metoda je enakovredna Smernici OECD za preskušanje 241 (2015). Preskus, s katerim se lahko ugotovijo in opredelijo škodljive posledice izpostavljenosti strupenim kemikalijam pri dvoživkah, je treba razviti in validirati zaradi pomislekov, da bi lahko okoljske ravni kemikalij povzročile škodljive učinke za ljudi in prostoživeče živali. V smernici OECD za preskušanje, ki se nanaša na preskus rasti in razvoja ličink dvoživk (LAGDA), je opisan preskus toksičnosti pri dvoživkah, v katerem se obravnavata rast in razvoj od oploditve do zgodnjega juvenilnega obdobja. Pri tem preskusu (ki običajno traja 16 tednov) se ocenijo zgodnji razvoj, preobrazba, preživetje, rast in delna spolna zrelost. Omogoča tudi meritev vrste drugih končnih točk za diagnostično oceno kemikalij, ki so domnevni endokrini motilci (endocrine disrupting chemicals, EDC), ali drugih vrst snovi, ki so strupene za razvoj in razmnoževanje. Metoda, opisana v tej preskusni metodi, je izpeljana iz validacijskega dela v zvezi z navadno krempljarko (*Xenopus laevis*), ki ga je opravila agencija ZDA za varstvo okolja (U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA)), pri čemer je bilo podporno delo opravljeno na Japonskem (1). Čeprav se lahko druge vrste dvoživk prilagodijo podobnemu preskusnemu protokolu za rast in razvoj, pri čemer je pomembna komponenta možnost določitve genetskega spola, se posebne metode in opazovane končne točke, ki so podrobno opisane pri tej preskusni metodi, uporabljajo samo za *Xenopus laevis*.
2. Preskus LAGDA se pri dvoživkah uporablja kot preskus višje stopnje za pridobitev izčrpnjših podatkov o škodljivih učinkih glede na razmerje med koncentracijo in odzivom, ki so primerni za uporabo pri ugotavljanju in opredeljevanju nevarnosti ter oceni ekološkega tveganja. Preskus spada na raven 4 temeljnega okvira OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev (OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters), na kateri preskusi *in vivo* zagotavljajo tudi podatke o škodljivih učinkih na končne točke, pomembne za endokrini sistem (2). Splošni načrt poskusa zajema izpostavljenost zarodkov *X. laevis* v 8–10. fazi po Nieuwkoopu in Faberju (NF) (3) najmanj štirim različnim koncentracijam preskusne kemikalije (običajno razdeljenim na najmanj pollogaritemske intervale) in kontrole do 10 tednov po srednjem času do 62. faze NF v kontroli, z enim vmesnim podvzorcem v 62. fazi NF (≤ 45 po oploditvi; običajno približno 45 dni (dpo)). Pri vsaki preskusni koncentraciji so štirje ponovljeni vzorci, za kontrolo pa je osem ponovljenih vzorcev. Med končnimi točkami, ki se ocenjujejo med izpostavljenostjo (ob vmesnem podvzorcu in končnem vzorcu ob koncu preskusa), so tiste, ki kažejo na splošno toksičnost: smrtnost, nenormalno obnašanje in dejavnika rasti (dolžina in teža), ter končne točke, ki naj bi označevale posebno endokrino toksično delovanje, usmerjeno na fiziološke procese, ki jih nadzorujejo estrogini, androgeni ali ščitnica. Glavni poudarek te metode je na morebitnih učinkih, pomembnih za populacijo (tj. škodljivih učinkih za preživetje, razvoj, rast in reproduktivni razvoj), za izračun koncentracije brez opaznega učinka (NOEC) ali učinkovite koncentracije, ki povzroči x-odstotno spremembo (ECx) v izmerjeni končni točki. Opozoriti je sicer treba, da so pristopi z ECx redko primerni za tovrstne velike študije, pri katerih bo morda povečanje števila preskusnih koncentracij, da se omogoči določitev zelene ECx, neizvedljivo. Opozoriti je treba tudi, da metoda ne zajema same reproduktivne faze. Pojmi, uporabljeni v tej preskusni metodi, so opredeljeni v Dodatku 1.

ZAČETNI PREUDARKI IN OMEJITVE

3. Zaradi omejenega števila preskušanih kemikalij in laboratorijev, vključenih v validacijo tega razmeroma kompleksnega preskusa, in ker do zdaj obnovljivost med laboratoriji ni bila dokumentirana s podatki iz poskusov, se predvideva, da bo smernica OECD za preskušanje 241 pregledana in po potrebi spremenjena glede na pridobljene izkušnje, ko bo na voljo zadostno število študij za ugotovitev učinka tega novega koncepta študije. LAGDA je pomemben preskus za obravnavanje morebitnih dejavnikov, ki prispevajo k zmanjševanju populacije dvoživk, pri katerem se ocenjujejo učinki izpostavljenosti kemikalijam med občutljivo fazo ličinke, v kateri lahko učinki na preživetje in razvoj, vključno z normalnim razvojem reproduktivnih organov, škodljivo vplivajo na populacije.
4. Preskus je zasnovan za odkrivanje učinkov na višjem nivoju, ki izhajajo iz endokrinih in neendokrinih mehanizmov, ter vključuje diagnostične končne točke, ki so delno specifične za ključne endokrine načine delovanja. Opozoriti je treba, da pred razvojem preskusa LAGDA ni obstajal noben validiran preskus, ki bi služil tej funkciji za dvoživke.
5. Pred začetkom preskusa je pomembno imeti informacije o fizikalno-kemijskih lastnostih preskusne kemikalije, zlasti da se omogoči priprava stabilnih raztopin kemikalije. Prav tako je treba imeti ustrezno občutljivo analitsko metodo za preverjanje koncentracij preskusne kemikalije. Za preskus, ki traja približno 16 tednov, je potrebnih skupaj 480 živali, tj. zarodkov *X. laevis* (ali 640 zarodkov, če se uporabi kontrola s topilom), da se zagotovi zadostna moč preskusa za oceno končnih točk, pomembnih za populacijo, kot so rast, razvoj in spolna zrelost.
6. Pred uporabo preskusne metode za regulativno preskušanje zmesi je treba preučiti, ali bo dala sprejemljive rezultate za predvideni regulativni namen. Poleg tega se s tem preskusom plodnost ne ocenjuje neposredno, zato morda ne bo uporaben na poznejši stopnji po ravni 4 temeljnega okvira OECD za preskušanje in ocenjevanje endokrinih motilcev.

ZNANSTVENA PODLAGA ZA PRESKUSNO METODO

7. Veliko sedanjega znanja o biologiji dvoživk je bilo pridobljenega z uporabo laboratorijske modelne vrste *X. laevis*. Ta vrsta se lahko rutinsko goji v laboratoriju, ovulacija se lahko sproži z uporabo humanega horionskega gonadotropina (hCG), staleži živali pa so na voljo pri komercialnih rejcih.
8. Kot pri vseh vretenčarjih razmnoževanje pri dvoživkah poteka pod nadzorom osi hipotalamus–hipofiza–spolne žleze (HPG) (4). Posredniki v tem endokrinem sistemu so estrogeni in androgeni, ki narekujejo razvoj in fiziologijo spolno dimorfnih tkiv. V življenjskem ciklu dvoživk obstajajo tri ločene faze, ko je ta os še posebno aktivna: (1) diferenciacija spolnih žlez med razvojem ličinke, (2) razvoj sekundarnih spolnih značilnosti in zorenje spolnih žlez v juvenilni fazi ter (3) funkcionalno razmnoževanje odraslih osebkov. V vsaki od teh treh razvojnih faz se lahko pojavijo endokrine motnje, ki jih povzročajo nekatere kemikalije, kot so estrogeni in androgeni, ki nazadnje privedejo do izgube reproduktivne sposobnosti organizmov.
9. Spolne žleze se začnejo razvijati v 43. fazi NF, ko se prvič razvije bipotencialni genitalni greben. Diferenciacija spolnih žlez se začne v 52. fazi NF, ko primordiale zarodne celice bodisi migrirajo v mozgovno tkivo (samci) bodisi ostanejo v kortikalni regiji (samice) razvijajočih se spolnih žlez (3). O dovzetnosti tega procesa spolne diferenciacije spolnih žlez za kemijske spremembe pri *Xenopus* se je prvič poročalo v 50. letih prejšnjega stoletja (5) (6). Izpostavljenost paglavcev estradiolu v tem obdobju diferenciacije spolnih žlez privede do zamenjave spola pri samcih, ki so v odrasli dobi popolnoma funkcionalne samice (7) (8). Mogoča je tudi zamenjava funkcionalnega spola samic v samce, o kateri se je poročalo po vsaditvi tkiva testisov v paglavce (9). Čeprav izpostavljenost inhibitorju aromataze

povzroči zamenjavo funkcionalnega spola tudi pri *X. tropicalis* (10), pa ni bilo dokazano, da se to zgodi pri *X. laevis*. V preteklosti so se učinki strupenih snovi na diferenciacijo spolnih žlez ocenjevali s histološkim pregledom spolnih žlez ob preobrazbi, tako da se je zamenjava spola lahko določila le z analizo razmerij med spoloma. Do nedavnega ni bilo sredstev za neposredno določitev genetskega spola *Xenopus*. Vendar pa je zaradi nedavne določitve s spolom povezanih označevalcev pri *X. laevis* mogoče določiti genetski spol, kar omogoča neposredno opredelitev živali z zamenjanim spolom (11).

10. Pri samcih se razvoj juvenilnih osebkov nadaljuje z zvišanjem ravni testosterona v krvi, kar sovpada z razvojem sekundarnih spolnih značilnosti in testisov. Pri samicah jajčniki proizvajajo estradiol, kar povzroči pojav vitelogenina (VTG) v plazmi, vitelogeninskih oocitov v jajčniku in razvoj jajcevodov (12). Jajcevodi so sekundarna spolna značilnost pri samicah in delujejo pri zorenju oocitov med razmnoževanjem. Ko oociti potujejo po jajcevodu in se zberejo v jajčni vrečki, pripravljeni za oploditev, je njihova zunanost obdana s sluzastim ovojem. Zdi se, da razvoj jajcevodov regulirajo estrogeni, saj je povezan z ravnmi estradiola v krvi pri *X. laevis* (13) in *X. tropicalis* (12). Obstajajo poročila o razvoju jajcevodov pri samcih po izpostavljenosti polikloriranim bifenilom (14) in 4-terc-oktilfenolu (15).

NAČELO PRESKUSA

11. Načrt preskusa zajema izpostavljenost zarodkov *X. laevis* v 8.–10. fazi NF prek vodne poti štirim različnim koncentracijam preskusne kemikalije in kontrole do 10 tednov po srednjem času do 62. faze NF v kontroli, z enim vmesnim podvzorcem v 62. fazi NF. Čeprav je mogoče visoko hidrofobne kemikalije odmerjati tudi prek hrane, je bilo do danes pridobljenih malo izkušenj z uporabo te poti izpostavljenosti v tem preskusu. Pri vsaki preskusni koncentraciji so štirje ponovljeni vzorci, pri vsaki uporabljeni kontroli pa je osem ponovljenih vzorcev. Med končnimi točkami, ki se ocenjujejo med izpostavljenostjo, so tiste, ki kažejo na splošno toksičnost (tj. smrtnost, nenormalno obnašanje in dejavnika rasti (dolžina in teža)), ter končne točke, ki naj bi označevale posebno endokrino toksično delovanje, usmerjeno na fiziološke procese, ki jih nadzorujejo estrogeni, androgeni ali ščitnica (tj. histopatologija ščitnice, histopatologija spolnih žlez in spolnih vodov, nenormalni razvoj, vitelogenin v plazmi (neobvezno) in razmerja med genotipskim/fenotipskim spolom).

MERILA ZA VELJAVNOST PRESKUSA

12. Uporabljajo se naslednja merila za veljavnost preskusa:

- koncentracija raztopljenega kisika mora biti med celotnim preskusom ≥ 40 % nasičenosti z zrakom;
- temperatura vode mora biti v območju 21 ± 1 °C, razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranji pa ne smejo presegati 1,0 °C;
- pH preskusne raztopine je treba vzdrževati med 6,5 in 8,5, razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranji pa ne smejo presegati 0,5;
- na voljo morajo biti dokazi, da so se koncentracije preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževale v okviru ± 20 % srednjih izmerjenih vrednosti;
- smrtnost v obdobju izpostavljenosti mora biti ≤ 20 -odstotna v vsakem ponovljenem vzorcu v kontrolah;

- ≥ 70 -odstotna viabilnost v mrestu, izbranem za začetek študije;
 - srednji čas do 62. faze NF v kontrolah mora biti ≤ 45 dni;
 - srednja teža preskusnih organizmov pri 62. fazi NF in ob koncu preskusa v kontrolah in kontrolah s topilom (če se uporabijo) mora biti $1,0 \pm 0,2$ g oziroma $11,5 \pm 3$ g.
13. Čeprav to ni merilo za veljavnost, je priporočljivo, da so za analizo na voljo vsaj tri ravni tretiranja s tremi neogroženimi ponovljenimi vzorci. Čezmerna smrtnost, ki ogroža tretiranje, je opredeljena kot > 4 smrtni primeri ($> 20\%$) v dveh ali več ponovljenih vzorcih, ki jih ni mogoče pojasniti s tehnično napako. Za analizo morajo biti na voljo vsaj tri ravni tretiranja brez očitne toksičnosti. Znaki očitne toksičnosti lahko med drugim vključujejo lebdenje na gladini, ležanje na dnu akvarija, obrnjen ali nepravilen način plavanja, odsotnost površinske aktivnosti in neodzivanje na dražljaje, morfološke nenormalnosti (npr. deformacije krakov), hemoragične lezije in edeme v trebušni votlini.
14. Če je ugotovljeno odstopanje od meril za veljavnost preskusa, je treba posledice obravnavati glede na zanesljivost rezultatov preskusa ter ta odstopanja in razmisleke vključiti v poročilo o preskusu.

OPIS METOD

Oprema

15. Običajna laboratorijska oprema in zlasti naslednje:
- (a) naprave za nadzor temperature (npr. grelniki ali hladilniki (prilagodljivi do $21\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$));
 - (b) termometer;
 - (c) binokularni stereomikroskop in pripomočki za seciranje;
 - (d) digitalni fotoaparati z ločljivostjo vsaj 4 milijone slikovnih točk in funkcijo mikro (po potrebi);
 - (e) analitska tehtnica, s katero je mogoče meriti na $0,001\text{ mg}$ ali $1\text{ }\mu\text{g}$ natančno;
 - (f) merilnik raztopljenega kisika in merilnik vrednosti pH;
 - (g) merilnik jakosti svetlobe, s katerim je mogoče meriti v luksih.

Voda

Vir in kakovost

16. Uporabi se lahko vsaka lokalno razpoložljiva voda za redčenje (npr. izvirska voda ali vodovodna voda, prečiščena z ogljem), ki omogoča normalno rast in razvoj *X. laevis*, na voljo pa morajo biti dokazi o normalni rasti v tej vodi. Ker se lahko kakovost lokalne vode med posameznimi območji bistveno razlikuje, je treba izvesti analizo kakovosti vode, zlasti če niso na voljo podatki iz preteklih preskusov o uporabi vode za gojenje ličink dvoživk. Meritve težkih kovin (npr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), glavnih anionov in kationov (npr. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), pesticidov, skupnega organskega ogljika in suspendiranih trdnih snovi je treba izvesti pred začetkom preskusa in/ali na primer vsakih šest mesecev, kadar se ve, da je kakovost vode za redčenje relativno konstantna. Nekatere kemijske značilnosti sprejemljive vode za redčenje so navedene v Dodatku 2.

Koncentracija jodida v preskusni vodi

17. Da lahko ščitnična žleza sintetizira ščitnične hormone za podporo normalni preobrazbi, mora imeti ličinka na voljo dovolj jodida v vodi in hrani. Trenutno ni empiričnih smernic za najmanjše koncentracije jodida v hrani ali vodi za zagotovitev pravilnega razvoja. Vendar lahko razpoložljivost jodida vpliva na odzivnost ščitničnega sistema na snovi, ki vplivajo na ščitnico, in spremeni bazalno aktivnost ščitnične žleze, kar je treba upoštevati pri razlagi rezultatov histopatologije ščitnice. Na podlagi predhodnega dela je bilo dokazano, da je preskus uspešen, kadar so koncentracije jodida (I^-) v vodi za redčenje med 0,5 in 10 $\mu\text{g/l}$. Najprimernejša najmanjša koncentracija jodida v vodi za redčenje med celotnim preskusom je 0,5 $\mu\text{g/l}$ (dodan kot natrijeva ali kalijevega sol). Če je preskusna voda modelna razredčevalna voda iz deionizirane vode, je treba dodati najmanjšo koncentracijo joda, tj. 0,5 $\mu\text{g/l}$. Izmerjene koncentracije jodida v preskusni vodi (tj. vodi za redčenje) in dodajanje jodovih ali drugih soli v preskusno vodo (če se uporabi) je treba navesti v poročilu. Vsebnost joda se lahko izmeri ne le v preskusni vodi, ampak tudi v hrani.

Sistem izpostavljenosti

18. Preskus je bil razvit z uporabo pretočnega sistema za redčenje. Sestavni deli sistema, ki pridejo v stik z vodo, morajo biti iz stekla, nerjavnega jekla in/ali drugih kemijsko inertnih materialov. Posode za izpostavljanje morajo biti akvariji iz stekla ali nerjavnega jekla, uporabna prostornina akvarija pa mora biti med 4,0 in 10,0 l (najmanjša globina vode med 10 in 15 cm). Sistem mora podpirati vse koncentracije izpostavljenosti in kontrolo ter po potrebi kontrolo s topilom, s štirimi ponovljenimi vzorci na tretiranje in osmimi v kontrolah. Pretok v posameznem akvariju mora biti konstanten zaradi vzdrževanja bioloških pogojev in izpostavljenosti kemikaliji. Priporočljivo je, da so pretoki ustrezni (npr. najmanj 5 izmenjav v akvarijih na dan), da se prepreči zmanjšanje koncentracije kemikalije zaradi metabolizma preskusnih organizmov in vodnih mikroorganizmov, prisotnih v akvarijih, ali abiotskih poti razkroja (hidroliza, fitoliza) ali disipacije (izhlapevanje, sorpcija). Tretirane akvarije je treba naključno dodeliti na položaj v sistemu izpostavljenosti, da se zmanjšajo potencialni učinki zaradi položaja, vključno z majhnimi razlikami v temperaturi, jakosti svetlobe itd. Več informacij o vzpostavitvi pretočnega sistema izpostavljenosti je na voljo v Standardnih smernicah ASTM za izvajanje preskusov akutne toksičnosti na preskusnih materialih z ribami, velikimi vretenčarji in dvoživkami (16).

Dodajanje kemikalije: priprava preskusnih raztopin

19. Za vnos preskusnih raztopin v sistem izpostavljenosti je treba osnovno raztopino preskusne kemikalije v sistem izpostavljenosti odmerjati z ustrezno črpalko ali drugo napravo. Pretok osnovne raztopine je treba pred začetkom izpostavljenosti umeriti v skladu z analitsko potrditvijo preskusnih raztopin in ga med preskusom redno volumetrično preverjati. Preskusno raztopino v vsaki komori je treba obnavljati z najmanj 5 izmenjavami količine/dan.

20. Metoda, ki se uporablja za uvajanje preskusne kemikalije v sistem, se lahko razlikuje glede na njene fizikalno-kemijske lastnosti. Zato je treba pred preskusom pridobiti osnovne informacije o kemikaliji, ki so ustrezne za določitev njene preverljivosti. Med uporabne informacije o specifičnih lastnostih preskusne kemikalije spadajo strukturna formula, molekulska masa, čistost, obstojnost v vodi in na svetlobi, pK_a in K_{ow} , topnost v vodi (po možnosti v preskusnem mediju), parni tlak in rezultati preskusa za lahko biološko razgradljivost (preskusna metoda C.4 (17) ali C.29 (18)). Topnost in parni tlak se lahko uporabita za izračun Henryjeve konstante, ki pokaže, ali so verjetne izgube zaradi izhlapevanja preskusne kemikalije. O izvedbi tega preskusa brez zgoraj navedenih informacij je treba skrbno razmisliti, saj bo načrt študije odvisen od fizikalno-kemijskih lastnosti preskusne kemikalije, brez teh podatkov pa bo morda rezultate preskusa težko razložiti ali pa bodo brez pomena. Na voljo mora biti zanesljiva analitska metoda za kvantifikacijo preskusne kemikalije v preskusnih raztopinah z znano in izpričano točnostjo ter mejo zaznavnosti. Vodotopne preskusne kemikalije se lahko raztopijo v alikvotih vode za redčenje pri koncentraciji, ki omogoča dodajanje pri ciljni preskusni koncentraciji v pretočnem sistemu. Za kemikalije, ki so pri sobni temperaturi tekoče ali trdne in zmerno topne v vodi, bodo morda potrebne saturacijske kolone (npr. iz steklene volne) tekočina: tekočina ali tekočina: trdna snov (19). Čeprav je mogoče zelo hidrofobne preskusne kemikalije odmerjati tudi prek hrane, je bilo pridobljenih malo izkušenj z uporabo te poti izpostavljenosti v tem preskusu.
21. Preskusne raztopine izbranih koncentracij se pripravijo z redčenjem osnovne raztopine. Osnovno raztopino je treba po možnosti pripraviti preprosto z mešanjem ali stresanjem preskusne kemikalije v vodi za redčenje z mehanskimi sredstvi (npr. z mešanjem in/ali ultrazvokom). Za pridobitev primerno koncentrirane osnovne raztopine se lahko uporabijo saturacijske kolone/sistemi ali metode pasivnega odmerjanja (20). Zaželeno je uporaba preskusnega sistema brez pomožnega topila; vendar imajo različne preskusne kemikalije različne fizikalno-kemijske lastnosti, zaradi katerih bodo verjetno potrebni različni pristopi za pripravo vode za izpostavljenost kemikalijam. Čim bolj si je treba prizadevati za neuporabo topil ali nosilcev, ker: (1) lahko nekatera topila povzročijo toksičnost in/ali neželene ali nepričakovane odzive, (2) lahko preskušanje kemikalij nad njihovo vodotopnostjo (kar se lahko pogosto zgodi pri uporabi topil) privede do netočnih določitev učinkovitih koncentracij, (3) lahko uporaba topil v dolgotrajnejših preskusih privede do znatne stopnje razvoja biofilma, povezanega z mikrobno dejavnostjo, kar lahko vpliva na okoljske pogoje in zmožnost vzdrževanja koncentracij izpostavljenosti, ter (4) ob neobstoju preteklih podatkov, ki kažejo, da topilo ne vpliva na rezultat študije, uporaba topil zahteva kontrolno tretiranje s topilom, kar ima precejšnje posledice za dobrobit živali, saj so za izvedbo preskusa potrebne dodatne živali. Za kemikalije, ki jih je težko preskusiti, se lahko kot zadnja rešitev uporabi topilo, pri čemer je treba za določitev najboljše metode upoštevati Smernico OECD za preskušanje toksičnosti zahtevnih snovi in zmesi v vodnem okolju (21). Topilo se izbere na podlagi kemijskih lastnosti preskusne kemikalije in razpoložljivosti preteklih kontrolnih podatkov o topilu. Ob neobstoju preteklih podatkov je treba primernost topila določiti pred izvedbo dokončne študije. Če se uporabi topilo ni mogoče izogniti in se pojavi mikrobna dejavnost (razvoj biofilma), se priporoča evidentiranje/sporočanje razvoja biofilma po akvarijih (vsaj tedensko) med celotnim preskusom. V idealnih razmerah bi morala biti koncentracija topila konstantna v kontroli s topilom in vseh preskusnih tretiranjih. Če koncentracija topila ni konstantna, je treba v kontroli s topilom uporabiti najvišjo koncentracijo topila v preskusnem tretiranju. Kadar se uporabi topilo kot nosilec, najvišje koncentracije topila ne smejo presegati 100 $\mu\text{l/l}$ ali 100 mg/l (21), priporočljivo pa je tudi, da koncentracija topila ostane čim nižja (npr. $\leq 20 \mu\text{l/l}$), da bi se izognili možnim učinkom topila na izmerjene končne točke (22).

Preskusne živali

Preskusna vrsta

22. Preskusna vrsta je *X. laevis*, ker: (1) se rutinsko goji v laboratorijih po vsem svetu, (2) se lahko enostavno pridobi prek komercialnih dobaviteljev in (3) je mogoče pri njej določiti genetski spol.

Oskrba odraslih osebkov in razmnoževanje

23. Ustrezna oskrba in razmnoževanje *X. laevis* sta opisana s standardnimi smernicami (23). Nastanitev in skrb za *X. laevis* je opisal tudi Read (24). Za začetek razmnoževanja se v tri do pet parov odraslih samic in samcev intrape-ritonealno injicira humani horionski gonadotropin (hCG). V samice in samce se injicira npr. približno 800–1 000 IU oziroma 500–800 IU hCG, raztopljenega v 0,6–0,9-odstotni solni raztopini (npr. Ringerjeva raztopina za žabe,

fiziološka raztopina za uporabo pri dvoživkah). Injekcijski volumen mora biti približno 10 µl/g telesne teže (~ 1 000 µl). Pari, pri katerih se je začelo razmnoževanje, so nato v velikih akvarijih v okolju, ki jih ne ovira, in v statičnih pogojih, da se spodbuja amplexus. Dno vsakega akvarija za razmnoževanje mora imeti navidezno dno iz mreže iz nerjavnega jekla (npr. 1,25 cm velike odprtine), ki omogoča prehajanje jajčec na dno akvarija. Žabe, v katere je bil hCG injiciran pozno popoldne, običajno odložijo večino jajčec do sredine naslednjega dopoldneva. Ko je odloženih in oplojenih dovolj jajčec, je treba odrasle osebkke odstraniti iz akvarijev za razmnoževanje. Jajčeca se nato zberejo, sluzast ovoj pa se odstrani s tretiranjem z L-cisteinom (23). Pripravi je treba 2-odstotno L-cisteinsko raztopino, vrednost pH pa prilagoditi na 8,1 z 1 M NaOH. Ta raztopina s temperaturo 21 °C se doda v 500-mililitrsko erlenmajerico, ki vsebuje jajčeca iz enega samega mresta, nato pa se eno do dve minuti nežno meša in temeljito od 6- do 8-krat spere z vodo za gojenje s temperaturo 21 °C. Jajčeca se nato prenesejo v kristalizirko in ugotovi se > 70-odstotna viabilnost z minimalnimi nenormalnostmi pri zarodkih, pri katerih se delijo celice.

NAČRT PRESKUSA

Preskusne koncentracije

24. Priporoča se uporaba najmanj štirih preskusnih koncentracij in ustreznih kontrol (vključno s kontrolami s topilom, če je to potrebno). Na splošno se priporoča razmik med koncentracijami (faktor razmika), ki ne presega 3,2.
25. Za namene tega preskusa je treba pri določitvi najvišje preskusne koncentracije, kolikor je mogoče, uporabiti rezultate iz obstoječih študij dvoživk, da se tako preprečijo očitno strupene koncentracije. K določitvi te koncentracije lahko prispevajo informacije iz, na primer, kvantitativnih razmerij med strukturo in aktivnostjo, navzkrižna branja in podatki iz obstoječih študij dvoživk, kot so preskus preobrazbe dvoživk, preskusna metoda C.38 (25) in preskus teratogeneze embriov žab – *Xenopus* (23) in/ali preskusi na ribah, kot so preskusne metode C.48, C.41 in C.49 (26) (27) (28). Pred izvedbo preskusa LAGDA se lahko izvede poskus za določanje območja. Priporočljivo je, da se izpostavljenost za določanje območja začne v 24 urah od oploditve in nadaljuje od 7 do 14 dni (ali po potrebi več), preskusne koncentracije pa se določijo tako, da intervali med njimi niso večji od faktorja 10. Rezultate poskusa za določanje območja je treba uporabiti za določitev najvišje preskusne koncentracije v preskusu LAGDA. Upoštevajte, da se lahko, če je treba uporabiti topilo, v okviru študije za določanje območja določi tudi primernost topila (tj. ali lahko vpliva na rezultat študije).

Ponovljeni vzorci v okviru tretiranih skupin in kontrol

26. Uporabiti je treba najmanj štiri ponovitvene akvarije na preskusno koncentracijo in najmanj osem ponovljenih vzorcev za kontrole (in kontrolo s topilom, če je potrebna) (tj. da se zagotovi ustrezna statistična moč, mora biti ponovljenih vzorcev v kontroli in morebitni kontroli s topilom dvakrat toliko kot ponovljenih vzorcev vsake tretirane skupine). Vsak ponovljeni vzorec lahko vsebuje največ 20 živali. Najmanjše število obdelanih živali bi bilo 15 (5 za podvzorec pri 62. fazi NF in 10 mladih osebkov). Vendar se v vsak ponovljeni vzorec dodajo dodatne živali, da se upošteva možnost pogina, pri čemer se vzdržuje kritično število 15.

POSTOPEK

Pregled preskusa

27. Preskus se začne z novoodloženimi zarodki (8.–10. faza NF) in nadaljuje do razvoja mladih osebkov. Živali se pregledujejo dnevno zaradi pogina in kakršnih koli znakov nenormalnega obnašanja. V 62. fazi NF se vzame podvzorec ličink (do 5 živali na ponovljeni vzorec) in preučijo se različne končne točke (preglednica 1). Ko vse živali dosežejo 66. fazo NF, tj. končano preobrazbo (ali 70 dni po začetku preskusa, odvisno od tega, kaj je prej), se izvede naključna izločitev (vendar brez podvzorčenja), da se zmanjša število živali (10 na akvarij) (glej odstavek 43), preostale živali pa ostanejo izpostavljene do 10 tednov po srednjem času do 62. faze NF v kontroli. Ob koncu preskusa (vzorčenje mladih osebkov) se izvedejo dodatne meritve (preglednica 1).

Pogoji izpostavljenosti

28. Celotni povzetek parametrov preskusa je v Dodatku 3. V obdobju izpostavljenosti je treba vsak dan meriti raztopljeni kisik, temperaturo in vrednost pH preskusnih raztopin. Prevodnost, alkalnost in trdota se merijo enkrat mesečno. Kar zadeva temperaturo vode preskusnih raztopin, razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranjem (v enem dnevu) ne smejo presegati 1,0 °C. Tudi pri pH preskusnih raztopin razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranjem ne smejo presegati 0,5.
29. Izpostavljeni akvariji se lahko vsak dan očistijo z izsesavanjem, da se odstranijo nezaužita hrana in odpadki, pri čemer je treba paziti, da ne pride do navzkrižne kontaminacije akvarijev. Čim bolj je treba zmanjšati stres in travmo za živali, zlasti med seljenjem, čiščenjem akvarija in ravnanjem z njimi. Preprečiti je treba stresne razmere/dejavnosti, kot so glasen in/ali nenehen hrup, trkanje po akvariju, tresljaji v akvariju.

Trajanje izpostavljenosti preskusni kemikaliji

30. Izpostavljenost se začne z novoodloženimi zarodki (8.–10. faza NF) in nadaljuje do 10 tednov po srednjem času do 62. faze NF (≤ 45 dni od začetka preskusa) v kontrolni skupini. Na splošno preskus LAGDA traja 16 tednov (največ 17 tednov).

Začetek preskusa

31. Za starše, ki se uporabijo za začetek preskusa, je treba predhodno dokazati, da proizvajajo potomce, ki jim je mogoče določiti genetski spol (Dodatek 5). Po mrestenju odraslih osebkov se zarodki odvzamejo, tretirajo s cisteinom, da se odstrani sluzasti ovoj, in presejejo za viabilnost (23). Tretiranje s cisteinom omogoča ravnanje z zarodki med presejalnim pregledom, ne da bi se ti prijemali na površine. Presejalni pregled se opravi pod stereomikroskopom z ustrezno veliko kapalko, da se odstranijo neviabilni zarodki. Zaželeno je, da se za preskus uporabi en sam mrest z več kot 70-odstotno viabilnostjo. Zarodki v 8.–10. fazi NF se naključno razdelijo v tretirane akvarije za izpostavljenost, ki vsebujejo ustrezno količino vode za redčenje, dokler ni v vsakem akvariju po 20 zarodkov. Med tem prenosom je treba z zarodki ravnati zelo previdno, da se čim bolj zmanjša stres zaradi prenosa in preprečijo poškodbe. V 96 urah po oploditvi se morajo paglavci premakniti navzgor po vodnem stolpcu in se začeti prijemati na stranice akvarija.

Način hranjenja

32. Hrana in stopnja hranjenja se v različnih življenjskih fazah *X. laevis* razlikujeta in sta zelo pomemben vidik protokola LAGDA. Čezmerno hranjenje v fazi ličink običajno privede do povečane pojavnosti in resnosti skolioze (Dodatek 8), zato se mu je treba izogibati. Po drugi strani nezadostno hranjenje v fazi ličink privede do zelo različnih hitrosti razvoja med kontrolami, kar lahko ogrozi statistično moč ali vpliva na rezultate preskusa. V Dodatku 4 sta navedena priporočena prehrana in način hranjenja ličink in mladih osebkov *X. laevis* v pretočnih razmerah, vendar pa so dopustne druge možnosti, če preskusni organizmi zadovoljivo rastejo in se razvijajo. Opozoriti je treba, da če se merijo končne točke, specifične za endokrini sistem, mora biti hrana brez endokrinih aktivnih snovi, kot je sojina moka.

Hranjenje ličink

33. Priporočena prehrana ličink je sestavljena iz začetne hrane za postrvi, ploščic alg *spirulina* in čipsa za zlate ribice (npr. kosmiči TetraFin®, Tetra, Nemčija), zmešanih skupaj v vodi za gojenje (ali redčenje). Ta mešanica se daje trikrat dnevno ob delovnikih in enkrat dnevno ob koncu tedna. Pglavci se od 8. dne po oploditvi hranijo tudi s 24-ur starimi živimi navplji solinskih rakcev vrste *Artemia*, in sicer dvakrat dnevno ob delovnikih in enkrat dnevno ob koncu tedna. Hranjenje ličink, ki mora biti skladno v vseh preskusnih posodah, mora omogočati ustrezno rast in razvoj preskusnih živali, da se zagotovita obnovljivost in prenosljivost rezultatov preskusa: (1) srednji čas do 62. faze NF v kontrolah mora biti ≤ 45 dni in (2) pri 62. fazi NF v kontrolah je priporočena srednja teža v območju $1,0 \pm 0,2$ g.

Hranjenje mladih osebkov

34. Ko je preobrazba končana, je prehrana sestavljena iz visokokakovostne toneče hrane za žabe, npr. Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, Florida, ZDA) (Dodatek 4). Za žabice (zgodnje mlade osebke) se peleti na hitro zmeljejo v kavnem mlinčku ali mešalniku ali zdrobijo v možnarju, da se zmanjšajo. Ko so mladi osebki dovolj veliki, da lahko zaužijejo cele pelete, mletje ali drobljenje ni več potrebno. Živali je treba hraniti enkrat dnevno. Tudi hranjenje mladih osebkov mora omogočati ustrezno rast in razvoj organizmov: pri kontrolnih mladih osebkih je ob koncu preskusa priporočena srednja teža v območju $11,5 \pm 3$ g.

Analitična kemija

35. Pred začetkom preskusa je treba oceniti stabilnost preskusne kemikalije (npr. topnost, razgradljivost in hlapnost) in določiti vse potrebne analitske metode, na primer na podlagi obstoječih informacij ali znanja. Pri odmerjanju prek vode za redčenje je priporočeno, da se preskusne raztopine iz vsakega ponovitvenega akvarija analizirajo pred začetkom preskusa, da se preveri učinkovitost sistema. V obdobju izpostavljenosti se koncentracije preskusne kemikalije določajo v ustreznih časovnih razmikih, po možnosti vsak teden za vsaj en ponovljeni vzorec v vsaki tretirani skupini, pri čemer se vsak teden rotira med ponovljenimi vzorci iste tretirane skupine. Priporočljivo je, da rezultati temeljijo na izmerjenih koncentracijah. Če pa se je koncentracija preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževala znotraj ± 20 % nominalne koncentracije ves čas preskusa, lahko rezultati temeljijo na nominalnih ali izmerjenih vrednostih. Prav tako je treba tudi koeficient variacije (CV) izmerjenih preskusnih koncentracij v celotnem obdobju preskusa v okviru tretiranja pri vsaki koncentraciji vzdrževati pri največ 20 %. Če izmerjene koncentracije ne ostanejo v območju 80–120 % nominalne koncentracije (kadar se na primer preskušajo zelo biorazgradljive ali adsorptivne kemikalije), je treba koncentracije z učinkom pri pretočnih preskusih določiti in izraziti glede na aritmetično sredino koncentracij.
36. Pretoke vode za redčenje in osnovne raztopine je treba med celotnim trajanjem izpostavljenosti preverjati v ustreznih časovnih razmikih (npr. trikrat tedensko). V primeru kemikalij, ki jih pri nekaterih ali vseh nominalnih koncentracijah ni mogoče zaznati (npr. zaradi hitrega razkroja ali adsorpcije v preskusnih posodah ali opaznega kopičenja kemikalije v telesih izpostavljenih živali), je priporočljivo v vsaki komori prilagoditi stopnjo izmenjave preskusne raztopine, da bi preskusne koncentracije ostale čim bolj konstantne.

Opažanja in meritve končnih točk

37. Med končnimi točkami, ki se ocenjujejo med izpostavljenostjo, so tiste, ki kažejo na toksičnost, vključno s smrtnostjo, nenormalnim obnašanjem, kot so klinični znaki bolezni in/ali splošne toksičnosti, in dejavnika rasti (dolžina in teža), ter patološke končne točke, ki lahko ustrezajo tako splošni toksičnosti kot tudi endokrinemu delovanju, usmerjenemu na poti, ki jih nadzorujejo estrogene, androgene ali ščitnice. Poleg tega se lahko ob koncu preskusa neobvezno izmeri koncentracija VTG v plazmi. Meritev VTG lahko koristi pri razumevanju rezultatov študije v okviru endokrinih mehanizmov za domnevne EDC. Končne točke in časovni okvir meritev so povzeti v preglednici 1.

Preglednica 1

Pregled končnih točk preskusa LAGDA

Končne točke (*)	Dnevno	Vmesno vzorčenje (vzorčenje ličink)	Ob koncu preskusa (vzorčenje mladih osebkov)
Smrtnost in anomalije	X		
Čas do 62. faze NF		X	
Histo(pato)logija (ščitnične žleze)		X	
Morfometrija (rast po teži in dolžini)		X	X
Jetрно-somatski indeks (LSI)			X
Razmerje med genetskim/fenotipskim spolom			X
Histopatologija (spolne žleze, spolni vodi, ledvice in jetra)			X
Vitelogenin (VTG) (neobvezno)			X

(*) Vse končne točke se statistično analizirajo.

Smrtnost in dnevna opažanja

38. Vsak dan je treba pregledati, ali so v preskusnih akvarijih mrtve živali, in evidentirati pogine za posamezne akvarije. Mrtve živali je treba takoj, ko so opažene, odstraniti iz preskusnega akvarija. Razvojno fazo mrtvih živali je treba uvrstiti pred 58. fazo NF (pred pojavom sprednjih krakov), med 58. in 62. fazo NF, med 63. in 66. fazo NF (med 62. fazo NF in popolno resorpcijo repa) ali po 66. fazi NF (po fazi ličinke). Stopnje smrtnosti, ki presegajo 20 %, lahko kažejo neustrezne preskusne pogoje ali očitno toksične učinke preskusne kemikalije. Živali so za pogine, ki jih ne povzroča kemikalija, običajno najbolj občutljive v prvih nekaj dneh razvoja po mrestenju in med metamorfoznim klimaksom. Taka smrtnost je lahko razvidna iz kontrolnih podatkov.
39. Poleg tega je treba evidentirati vsako opaženo nenormalno obnašanje, zelo vidne deformnosti (npr. skoliozo) ali lezije. Opažene primere skolioze je treba prešteti (pojavnost) in oceniti glede na resnost (npr. neopazna – NO, minimalna – 1, zmerna – 2, huda – 3; Dodatek 8). Prizadevati si je treba za zagotovitev, da je prevalenca zmerne in hude skolioze ves čas študije omejena (npr. pod 10 % v kontrolah), čeprav večja prevalenca nenormalnosti v kontrolah ni nujno razlog za ustavitev preskusa. Za normalno obnašanje ličink je značilno, da plavajo v vodnem stolpcu z repom nad glavo, redno ritmično udarjajo z repno plavutjo, redno prihajajo na površino, premikajo škržni poklopec in se odzivajo na dražljaje. Nenormalno obnašanje bi na primer vključevalo lebdenje na gladini, ležanje na dnu akvarija, obrnjen ali nepravilen način plavanja, odsotnost površinske aktivnosti in neodzivanje na dražljaje. Pri živalih po preobrazbi je treba poleg zgoraj navedenega nenormalnega obnašanja evidentirati tudi velike razlike pri porabi hrane med tretiranci. Velike deformnosti in lezije lahko med drugim vključujejo morfološke nenormalnosti (npr. deformacije krakov), hemoragične lezije, edeme v trebušni votlini in bakterijske ali glivične okužbe. Pojav lezij na glavi mladih osebkov, takoj za nosnicami, je lahko znak nezadostne stopnje vlage. Te ugotovitve so kvalitativne, pri čemer jih je treba obravnavati podobno kot klinične znake bolezni/stresa in jih primerjati s kontrolnimi živalmi. Če je stopnja pojavnosti v izpostavljenih akvarijih večja kot v kontrolnih akvarijih, jo je treba obravnavati kot dokaz očitne toksičnosti.

Morfometrija (teža in dolžina)

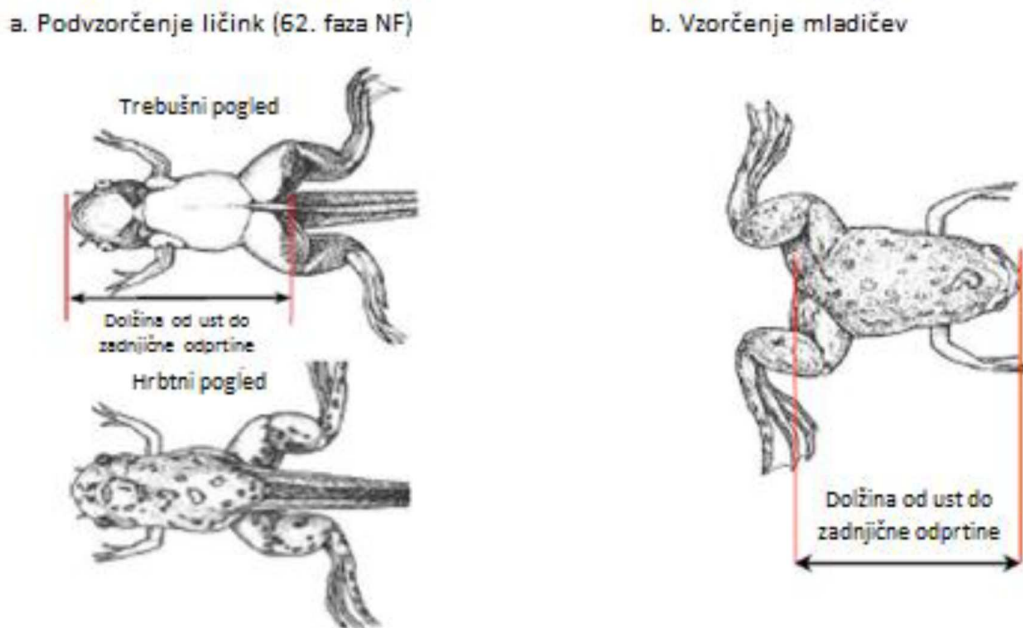
45. Moko težo (na mg natančno) in dolžino od ust do zadnjične odprtine (SVL) (na 0,1 mm natančno) vsakega paglavca je treba izmeriti takoj, ko z anestezijo postane neodziven (slika 2a). Za meritev SVL s fotografije se lahko uporabi programska oprema za analizo slike. Paglavce je treba pred tehtanjem osušiti s pivnikom, da se odstrani odvečna adherentna voda. Po meritvah velikosti (teža in SVL) je treba evidentirati ali zapisati vse velike morfološke nenormalnosti in/ali klinične znake toksičnosti, kot so skolioza (glej Dodatek 8), petehije ali hemoragija, priporoča pa se tudi digitalna dokumentacija. Petehije so majhne rdeče ali vijolične krvavitve v kožnih kapilarah.

Odvzem in fiksacija tkiva

46. Pri podvzorcju ličink se opravi histološka analiza ščitnične žleze. Spodnji del trupa za sprednjimi kraki se odstrani in zavrže. Obrezani trup se fiksira v Davidsonovem fiksativu. Fiksativa mora biti v posodi vsaj desetkrat več od približne prostornine tkiv. Za ustrezno fiksiranje zadevnih tkiv je treba doseči ustrezno mešanje ali kroženje fiksativa. Vsa tkiva ostanejo v Davidsonovem fiksativu najmanj 48 ur, vendar ne več kot 96 ur, nakar se sperejo v deionizirani vodi in shranijo v 10-odstotnem nevtralnem pufranem formalinu (1) (29).

Histologija ščitnice

47. Pri vsakem podvzorcju ličink (fiksirana tkiva) se opravi histološka preiskava ščitnične žleze, tj. diagnoza in ocena resnosti (29) (30).



Slika 2: Orientacijske točke za merjenje dolžine od ust do zadnjične odprtine pri preskusu LAGDA pri 62. fazi NF (a) in mladih žabah (b). Odločilne značilnosti pri 62. fazi NF (a): glava je enako široka kot trup, vohalni živec je krajši od premera vohalnega bulbusa (hrbni pogled), sprednja kraka pa sta v višini srca (trebušni pogled). Slike povzete po Nieuwkoopu in Faberju (1994).

Konec izpostavljenosti ličink

48. Glede na začetno število paglavcev se pričakuje, da bo verjetno majhen delež osebkov, ki se ne bodo razvili normalno in dokončali preobrazbe (66. faza NF) v razumnem času. Izpostavljenost ličink ne sme trajati več kot 70 dni. Vse preostale paglavce ob koncu tega obdobja je treba evtanazirati (glej odstavek 43), izmeriti njihovo moko težo in SVL, določiti fazo po Nieuwkoopu in Faberju, 1994, ter zabeležiti vse razvojne nenormalnosti.

Izločitev po 66. fazi NF

49. Od 66. faze NF (popolna resorpcija repa) mora do konca izpostavljenosti ostati deset osebkov na akvarij. Ko vse živali dosežejo 66. fazo NF ali po 70 dneh (odvisno od tega, kaj je prej), je zato potrebna izločitev. Živali po 66. fazi NF, ki ne bodo ostale izpostavljene, je treba izbrati naključno.
50. Živali, ki niso izbrane za nadaljnjo izpostavljenost, se evtanazirajo (glej odstavek 43). Pri vsaki živali se izmerijo razvojna faza, mokra teža in SLV (slika 2b) ter opravi makroskopska obdukcija. Fenotipski spol (na podlagi morfolologije spolnih žlez) se zabeleži kot samica, samec ali nedoločen.

Vzorčenje mladih osebkov*Pregled vzorčenja mladih osebkov*

51. Preostale živali ostanejo izpostavljene do 10 tednov po srednjem času do 62. faze NF v kontroli z vodo za redčenje (in/ali kontroli s topilom, če je ustrezno). Po koncu obdobja izpostavljenosti se preostale živali evtanazirajo (največ 10 žab na ponovljeni vzorec), pri čemer se izmerijo ali ocenijo in evidentirajo različne končne točke: (1) morfometrija (teža in dolžina), (2) razmerja med fenotipskim/genotipskim spolom, (3) teža jeter (jetno-somatski indeks), (4) histopatologija (spolne žleze, spolni vodi, jetra in ledvice) in neobvezno (5) VTG v plazmi.

Humana usmrtitev žab

52. Vzorci mladih osebkov, tj. žab po preobrazbi, se evtanazirajo z intraperitonealnim injiciranjem anestetika, npr. 10-odstotnega MS-222 v ustrezni raztopini fosfatnega pufru. Žabe se lahko vzorčijo, ko postanejo neodzivne (približno dve minuti po injiciranju, če se uporabi 10-odstotni MS-222 v odmerku 0,01 ml na g žabe). Čeprav bi se lahko mlade žabe potopile v višjo koncentracijo anestetika (MS-222), so izkušnje pokazale, da anesteziranje po tej metodi traja dlje in da zaradi tega vzorčenje morda ne bo mogoče. Z injiciranjem se zagotovi učinkovita in hitra evtanazija pred vzorčenjem. Vzorčenje se lahko začne šele, ko je potrjena neodzivnost žab, da se zagotovi, da so živali mrtve. Če so pri žabah vidni znaki precejšnjega trpljenja (zelo hudo trpljenje, pogin je mogoče zanesljivo napovedati) in se obravnavajo kot umirajoče, je treba živali anestezirati in evtanazirati ter jih za analizo podatkov obravnavati kot smrtne primere. Kadar se žaba evtanazira zaradi obolevnosti, je to treba zabeležiti in sporočiti. Odvisno od tega, kdaj med študijo je žaba evtanazirana, se lahko žaba zadrži za histopatološko analizo (fiksiranje žabe za morebitno histopatologijo).

Morfometrija (teža in dolžina)

53. Meritve mokre teže in SLV (slika 2b) so enake meritvam, predstavljenim pri podvzorčenju ličink.

VTG v plazmi (neobvezno)

54. VTG je splošno sprejet biooznačevalec, ki izhaja iz izpostavljenosti estrogenim kemikalijam. Za preskus LAGDA se lahko pri vzorcih mladih osebkov neobvezno izmeri VTG v plazmi (to je lahko še posebej ustrezno, kadar se zdi, da je preskusna kemikalija estrogen).
55. Pri evtanaziranem mladem osebkju se odrežeta zadnja kraka in odvzame kri s heparinizirano kapilaro (čeprav so lahko primerne druge metode odvzema krvi, na primer punkcija srca). Kri se iztisne v mikrocentrifugirko (npr. s prostornino 1,5 ml), in ta se centrifugira za pridobitev plazme. Vzorce plazme je treba do določitve VTG hraniti pri -70°C ali nižji temperaturi. Koncentracija VTG v plazmi se lahko izmeri z metodo encimskega imunskega testa (ELISA) (Dodatek 6) ali drugo metodo, kot je masna spektrometrija (31). Zaradi večje občutljivosti so zaželeni protitelesa, specifična za vrsto.

Določitev genetskega spola

56. Genetski spol vsake mlade žabe se oceni na podlagi označevalcev, ki so jih razvili Yoshimoto *et al.* (11). Za določitev genetskega spola se med seciranjem odvzame del zadnjega kraka (ali cel krak) (ali katerega koli drugega tkiva) in shrani v mikrocentrifugirki (vzorci tkiva žab se lahko vzamejo iz katerega koli tkiva). Do izolacije deoksiribonukleinske kisline (DNK) se lahko tkivo shrani pri -20°C ali nižji temperaturi. Izolacija DNK iz tkiv se lahko opravi s pripomočki, ki so na voljo na trgu, prisotnost ali odsotnost označevalca pa se analizira z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) (Dodatek 5). Na splošno je ujemanje med histološkim spolom in genotipom pri kontrolnih živalih ob vzorčenju mladih osebkov v kontrolnih skupinah več kot 95-odstotno.

Odvzem in fiksacija tkiva za histopatologijo

57. Pri končnem vzorčenju se za histološko analizo odvzamejo spolne žleze, spolni vodi, ledvice in jetra. Trebušna votlina se odpre, jetra se izrežejo in stehtajo. Nato se iz spodnjega dela trebušne votline previdno odstranijo prebavni organi (npr. želodec, čreva), da se razkrijejo spolne žleze, ledvice in spolni vodi. Zabeležiti je treba vse velike morfološke nenormalnosti v spolnih žlezah. Nazadnje je treba odstraniti zadnja kraka, če nista bila predhodno odstranjena že za odvzem krvi. Odvzeta jetra in trup s spolnimi žlezami *in situ* je treba nemudoma vnesti v Davidsonov fiksativ. Fiksativa mora biti v posodi vsaj desetkrat več od približne prostornine tkiv. Vsa tkiva ostanejo v Davidsonovem fiksativu najmanj 48 ur, vendar ne več kot 96 ur, nakar se sperejo v deionizirani vodi in shranijo v 10-odstotnem nevtralnem pufranem formalinu (1) (29).

Histopatologija

58. Pri vsakem vzorcu mladega osebka se opravi histološka ocena patoloških sprememb v tkivu spolnih žlez, spolnih vodov, jeter in ledvic, tj. diagnoza in ocena resnosti (32). Iz te ocene se izpelje tudi fenotip spolnih žlez (npr. jajčnik, testis, dvospolna), pri čemer se lahko te ugotovitve skupaj z meritvami posameznega genetskega spola uporabijo za izračun razmerij med fenotipskim/genotipskim spolom.

PODATKI IN POROČANJE

Statistična analiza

59. S preskusom LAGDA se pridobijo tri oblike podatkov, ki jih je treba statistično analizirati: (1) kvantitativni kontinuirani podatki (teža, SVL, LSI, VTG), (2) podatki o času do dogodka za razvojne stopnje (tj. dnevih do 62. faze NF od začetka preskusa) in (3) ordinalni podatki v obliki ocen resnosti ali razvojnih faz iz histopatoloških ocen.
60. Priporočljivo je, da načrt preskusa in izbira statističnega testa zagotavljata ustrezno moč opažanja biološko pomembnih sprememb pri končnih točkah, kjer se poroča o NOEC ali ECx. Priporočljivo je, da se pri statističnih analizah podatkov (na splošno na podlagi srednje vrednosti pri ponovljenem vzorcu) upoštevajo postopki, opisani v dokumentu Sedanji pristopi k statistični analizi podatkov o ekotoksičnosti: smernice za uporabo (33). Dodatek 7 te preskusne metode vsebuje priporočeno drevo odločanja za statistično analizo ter smernice za obdelavo podatkov in izbiro najustreznejšega statističnega testa ali modela za uporabo pri preskusu LAGDA.
61. Ker je genotipski spol določen za vse žabe, je treba podatke iz vzorčenja mladih osebkov (npr. rast, LSI) analizirati ločeno za vsak genotipski spol.

Pomisleki o analizi podatkov

Uporaba ogroženih ponovljenih vzorcev in tretiranj

62. Ponovljeni vzorci in tretiranja lahko postanejo ogroženi zaradi čezmerne smrtnosti zaradi očitne toksičnosti, bolezni ali tehnične napake. Če je tretiranje ogroženo zaradi bolezni ali tehnične napake, morajo biti za analizo na voljo tri neogrožena tretiranja s tremi neogroženimi ponovljenimi vzorci. Če se očitna toksičnost pojavi v zelo obremenjenih tretiranjih, je zaželeno, da so za analizo na voljo vsaj tri ravni tretiranj s tremi neogroženimi ponovljenimi vzorci (v skladu s pristopom najvišje tolerančne koncentracije za smernice OECD za preskušanje (34)). Znaki očitne toksičnosti lahko poleg smrtnosti vključujejo učinke na obnašanje (npr. lebdenje na gladini, ležanje na dnu akvarija, obrnjen ali nepravilen način plavanja, odsotnost površinske aktivnosti), morfološke lezije (npr. hemoragične lezije, edeme v trebušni votlini) ali inhibicijo normalnih odzivov na hranjenje pri kvalitativni primerjavi s kontrolnimi živalmi.

Kontrola s topilom

63. Ob koncu preskusa je treba izvesti oceno potencialnih učinkov topila (če se uporabi). Ocena se izvede s statistično primerjavo kontrolne skupine s topilom in kontrolne skupine z vodo za redčenje. Najpomembnejši končni točki, ki ju je treba obravnavati v tej analizi, sta dejavnika rasti (teža in dolžina), saj lahko nanju vplivajo splošne toksičnosti. Če se pri teh končnih točkah ugotovijo statistično značilne razlike med kontrolno skupino z vodo za redčenje in kontrolno skupino s topilom, je treba za ugotovitev, ali je veljavnost preskusa ogrožena, uporabiti najboljšo strokovno presojo. Če se dve kontrolni skupini razlikujeta, je treba tretirane skupine, izpostavljene kemikaliji, primerjati s kontrolo s topilom, razen če je znano, da je zaželena primerjava s kontrolo z vodo za redčenje. Če med dvema kontrolnima skupinama ni statistično značilne razlike, je priporočljivo, da se tretirane skupine, izpostavljene preskusni kemikaliji, primerjajo z združenima kontrolnima skupinama (kontrolna skupina s topilom in kontrolna skupina z vodo za redčenje), razen če je znano, da je zaželena primerjava le s kontrolno skupino z vodo za redčenje ali kontrolno skupino s topilom.

Poročilo o preskusu

64. V poročilo o preskusu se vključijo podatki, navedeni v nadaljevanju.

Preskusna kemikalija:

— fizikalne lastnosti in, če je ustrezno, fizikalno-kemijske lastnosti;

— snov iz ene sestavine:

fizični videz, topnost v vodi in dodatne pomembne fizikalno-kemijske lastnosti;

kemijski identifikacijski podatki, kot so ime po nomenklaturi IUPAC ali ime CAS, številka CAS, koda po sistemu SMILES ali identifikatorju InChI, strukturna formula, čistost, kemijska identiteta nečistoč, kot je ustrezno in praktično izvedljivo itd. (vključno z vsebnostjo organskega ogljika, če je to ustrezno);

— snov z več sestavinami, UVCB in zmesi:

čim obsežnejša opredelitev lastnosti s kemijsko identiteto (glej zgoraj), kvantitativnim pojavljanjem in ustreznimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi sestavin.

Preskusna vrsta:

— znanstveno ime, sev, če je na voljo, vir in metoda zbiranja oplojenih jajčec ter nadaljnje ravnanje;

— pojavnost skolioze v preteklih kontrolah za uporabljeno založno kulturo.

Preskusni pogoji:

— obdobje osvetljenosti;

— načrt preskusa (npr. velikost, material in vodna prostornina komor, število preskusnih komor in ponovljenih vzorcev, število preskusnih organizmov na ponovljeni vzorec);

— metoda priprave osnovnih raztopin in pogostost obnavljanja (navesti je treba sredstvo za raztapljanje in njegovo koncentracijo, če je uporabljeno);

— metoda odmerjanja preskusne kemikalije (npr. črpalke, sistemi za redčenje);

— analitski izkoristek metode in nominalne preskusne koncentracije, meja določljivosti, srednje izmerjene vrednosti in njihovi standardni odkloni v preskusnih posodah ter metoda, po kateri so bile pridobljene, in dokazi, da se meritve nanašajo na koncentracije preskusne kemikalije v dejanski raztopini;

— značilnosti vode za redčenje: pH, trdota, temperatura, koncentracija raztopljenega kisika, ravni preostalega klora (če so bile merjene), skupni jodid, skupni organski ogljik (če je bil merjen), suspendirane trdne snovi (če so bile merjene), slanost preskusnega medija (če je bila merjena) in druge izvedene meritve;

- nominalne preskusne koncentracije, srednje izmerjene vrednosti in njihovi standardni odkloni;
- kakovost vode v preskusnih posodah: pH, temperatura (dnevna) in koncentracija raztopljenega kisika;
- podrobne informacije o hranjenju (npr. vrsta hrane, vir, dana količina in pogostost).

Rezultati:

- dokazi, da so kontrole izpolnjevale merila za veljavnost;
 - podatki za kontrolne skupine (in kontrolo s topilom, kadar se uporabi) in tretirane skupine: opaženi smrtnost in nenormalnost, čas do 62. faze NF, histološka ocena ščitnice (samo pri vzorcu ličink), rast (teža in dolžina), LSI (samo pri vzorcu mladih osebkov), razmerje med genetskim/fenotipskim spolom (samo pri vzorcu mladih osebkov), rezultati histopatološke ocene za spolne žleze, spolne vode, ledvice in jetra (samo pri vzorcu mladih osebkov) in VTG v plazmi (samo pri vzorcu mladih osebkov, če se opravi);
 - pristop k statistični analizi in obdelava podatkov (uporabljeni statistični test ali model);
 - koncentracija brez opaznega učinka (NOEC) za vsak ocenjeni odziv;
 - najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC) za vsak ocenjeni odziv ($\alpha = 0,05$). EC_x za vsak ocenjeni odziv, če je ustrezno, intervali zaupanja (npr. 95-odstotni) in graf prilagojenega modela, uporabljenega za izračun, naklon krivulje odziva na koncentracijo, formula regresijskega modela, ocenjeni parametri modela in njihove standardne napake;
 - vsako odstopanje od preskusne metode in odkloni od meril za sprejemljivost ter razmisleki o morebitnih posledicah za rezultat preskusa.
65. Za rezultate meritev končnih točk je treba predstaviti srednje vrednosti in njihove standardne odklone (na podlagi ponovljenih vzorcev in koncentracij, če je mogoče).
66. Izračunati je treba srednji čas do 62. faze NF v kontrolah in ga predstaviti kot srednjo vrednost median ponovljenih vzorcev in njihovega standardnega odklona. Prav tako je treba za tretiranja izračunati mediano tretiranja in jo predstaviti kot srednjo vrednost median ponovljenih vzorcev in njihovega standardnega odklona.

VIRI

- (1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
- (2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 150), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.

-
- (3) Nieuwkoop, P. D., in Faber, J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, ZDA.
- (4) Kloas, W., in Lutz, I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. *Journal of Chromatography A* 1130: 16–27.
- (5) Chang, C., Witschi, E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Journal of the Royal Society of Medicine* 93: 140–144.
- (6) Gallien, L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 237: 1565.
- (7) Villalpando, I., in Merchant-Larios, H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. *International Journal of Developmental Biology* 34: 281–285.
- (8) Miyata, S., Koike, S., in Kubo, T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Zoological Science* 16: 335–340.
- (9) Mikamo, K., in Witschi, E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. *Genetics* 48: 1411.
- (10) Olmstead, A. W., Kosian, P. A., Korte, J. J., Holcombe, G. W., Woodis, K., in Degitz, S. J. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. *Aquatic Toxicology* 91: 143–150.
- (11) Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T., in Ito, M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2469–2474.
- (12) Olmstead, A. W., Korte, J. J., Woodis, K. K., Bennett, B. A., Ostazeski, S., in Degitz, S. J. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117–123.
- (13) Tobias, M. L., Tomasson, J., in Kelley, D. B. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. *Journal of Neurobiology* 37: 441–448.
- (14) Qin, Z. F., Qin, X. F., Yang, L., Li, H. T., Zhao, X. R., in Xu, X. B. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. *Aquatic Toxicology* 84: 321–327.

-
- (15) Porter, K. L., Olmstead, A. W., Kumsher, D. M., Dennis, W. E., Sprando, R. L., Holcombe, G. W., Korte, J. J., Lindberg-Livingston, A., in Degitz, S. J. (2011). Effects of 4-Tert-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. *Aquatic Toxicology* 103: 159–169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Filadelfija, Pensilvanija, ZDA.
- (17) Poglavje C.4 te priloge: Določanje ‚dobre‘ biorazgradljivosti.
- (18) Poglavje C.29 te priloge: Dobra biorazgradljivost – CO₂ v zaprtih posodah (preskus nadprostora).
- (19) Kahl, M. D., Russom, C. L., DeFoe, D. L., in Hammermeister, D. E. (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. *Chemosphere* 39: 539–551.
- (20) Adolfsson-Erici, M., Åkerman, G., Jahnke, A., Mayer, P., in McLachlan, M. S. (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. *Chemosphere*, 86(6): 593–9.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (št. 23), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (22) Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M. J., in Pickford, D. B. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Review. Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Filadelfija, Pensilvanija, ZDA.
- (24) Read, B. T. (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, Združeno kraljestvo, 84 str.
- (25) Poglavje C.38 te priloge: Preskus preobrazbe dvoživk.
- (26) Poglavje C.48 te priloge: Kratkotrajni preskus razmnoževanja rib.

- (27) Poglavje C.41 te priloge: Preskus spolnega razvoja rib.
- (28) Poglavje C.49 te priloge: Preskus akutne toksičnosti ribjega zarodka.
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 82), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (30) Grim, K. C., Wolfe, M., Braunbeck, T., Iguchi, T., Ohta, Y., Tooi, O., Touart, L., Wolf, D. C., in Tietge, J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, *Toxicological Pathology* 37: 415–424.
- (31) Luna, L. G., in Coady, K. (2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Techniques* 5(3): 194.
- (32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (št. 228), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (št. 54), Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Pariz.
- (34) Hutchinson, T. H., Bögi, C., Winter, M. J., Owens, J. W., 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. *Aquatic Toxicology* 91(3): 197–202.

Dodatek 1

OPREDELITVE POJMOV

Končna točka preskusa na višjem nivoju biološke organizacije: povzroča učinke na ravni populacije.

Kemikalija: snov ali zmes.

ELISA: encimski imunski test.

EC_x: (učinkovita koncentracija za x-odstotni učinek) je koncentracija, ki v primerjavi s kontrolo povzroči x-odstotni učinek na preskusni organizem v danem obdobju izpostavljenosti. EC₅₀ je na primer koncentracija, pri kateri je ocenjeno, da bo imela v določenem obdobju izpostavljenosti učinek na končno točko preskusa pri 50 % izpostavljene populacije.

dpo: dnevi po oploditvi.

Pretočni preskus: preskus, pri katerem se preskusne raztopine med izpostavljenostjo neprekinjeno pretakajo skozi preskusni sistem.

Os HPG: os hipotalamus–hipofiza–spolne žleze.

IUPAC: Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo.

Najnižja koncentracija z opaženim učinkom (LOEC): je najnižja preskušena koncentracija preskusne kemikalije, pri kateri se opazi, da ima kemikalija statistično značilen učinek (pri $p < 0,05$) v primerjavi s kontrolo. Vendar bi morale imeti vse preskusne koncentracije nad vrednostjo LOEC škodljiv učinek, ki je enak ali večji od škodljivega učinka, opaženega pri vrednosti LOEC. Če teh dveh pogojev ni mogoče izpolniti, je treba podrobno pojasniti način izbire vrednosti LOEC (in posledično NOEC). Smernice so zajete v Dodatku 7.

Srednja smrtna koncentracija (LC₅₀): je koncentracija preskusne kemikalije, za katero se oceni, da je med preskusom smrtonosna za 50 % preskusnih organizmov.

Koncentracija brez opaznega učinka (NOEC): je preskusna koncentracija takoj pod vrednostjo LOEC, ki v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega učinka ($p < 0,05$) v danem obdobju izpostavljenosti.

SMILES: sistem za poenostavljen zapis strukture molekul.

Preskusna kemikalija: vsaka snov ali zmes, preskušena s to preskusno metodo.

UVCB: snovi z neznano ali spremenljivo sestavo, kompleksni reakcijski produkti ali biološki materiali.

VTG: vitelogenin je fosfolipoglikoprotein in predstopnja beljakovin jajčnega rumenjaka, ki se običajno pojavi pri spolno aktivnih samicah vseh oviparnih vrst.

Dodatek 2

NEKATERE KEMIJSKE LASTNOSTI SPREJEMLJIVE VODE ZA REDČENJE

Snov	Mejna koncentracija
delci	5 mg/l
skupni organski ogljik	2 mg/l
neionizirani amoniak	1 µg/l
preostali klor	10 µg/l
skupni organofosforni pesticidi	50 ng/l
skupni organoklorni pesticidi in poliklorirani bifenili	50 ng/l
skupni organski klor	25 ng/l
aluminij	1 µg/l
arzen	1 µg/l
krom	1 µg/l
kobalt	1 µg/l
baker	1 µg/l
železo	1 µg/l
svinec	1 µg/l
nikelj	1 µg/l
cink	1 µg/l
kadmij	100 ng/l
živo srebro	100 ng/l
srebro	100 ng/l

Dodatek 3

PRESKUSNI POGOJI ZA PRESKUS LAGDA

- | | |
|---|---|
| 1. Preskusna vrsta | <i>Xenopus laevis</i> . |
| 2. Vrsta preskusa | Kontinuirani pretočni sistem. |
| 3. Temperatura vode | Nominalna temperatura je 21 °C. Srednja temperatura med trajanjem preskusa je 21 ± 1 °C (razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranjem ne smejo presežati 1,0 °C). |
| 4. Kakovost osvetlitve | Fluorescenčne sijalke (široki spekter), 600–2 000 luksov (lumnov/m ²) na površini vode. |
| 5. Obdobje osvetljenosti | 12 ur svetlobe, 12 ur teme. |
| 6. Količina preskusne raztopine in preskusna posoda (akvarij) | 4–10 l (najmanjša globina vode 10–15 cm). Akvarij iz stekla ali nerjavnega jekla. |
| 7. Izmenjave količine preskusnih raztopin | Konstantne zaradi vzdrževanja bioloških pogojev in izpostavljenosti kemikaliji (npr. 5 izmenjav količine na akvarij na dan). |
| 8. Starost preskusnih organizmov na začetku | 8.–10. faza po Nieuwkoopu in Faberju (NF). |
| 9. Število organizmov na ponovljeni vzorec | 20 živali (zarodkov)/akvarij (ponovljeni vzorec) ob začetku izpostavljenosti in 10 živali (mladih osebkov)/akvarij (ponovljeni vzorec) po 66. fazi NF do konca izpostavljenosti. |
| 10. Število tretiranj | Najmanj 4 tretiranja s preskusno kemikalijo in ustrezne kontrole. |
| 11. Število ponovljenih vzorcev na tretiranje | 4 ponovljeni vzorci na tretiranje za preskusno kemikalijo in 8 ponovljenih vzorcev za kontrole. |
| 12. Število organizmov na preskusno koncentracijo | Najmanj 80 živali na tretiranje za preskusno kemikalijo in najmanj 160 živali za kontrole. |
| 13. Voda za redčenje | Vsaka voda, ki omogoča normalno rast in razvoj <i>X. laevis</i> (npr. izvirska voda ali vodovodna voda, prečiščena z ogljem). |
| 14. Prezračevanje | Se ne zahteva, vendar bo prezračevanje akvarijev morda potrebno, če ravni raztopljenega kisika padejo pod priporočene meje in če povečanje pretoka preskusne raztopine doseže zgornjo mejo. |
| 15. Raztopljeni kisik preskusne raztopine | Raztopljeni kisik: ≥ 40 % vrednosti nasičenosti z zrakom ali $\geq 3,5$ mg/l. |

- | | |
|---|--|
| 16. pH preskusne raztopine | 6,5–8,5 (razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranjem ne smejo presegati 0,5). |
| 17. Trdota in alkalnost preskusne raztopine | 10–250 mg CaCO ₃ /l. |
| 18. Način hranjenja | (Glej Dodatek 4.) |
| 19. Obdobje izpostavljenosti | Od 8.–10. faze NF do desetih tednov po srednjem času do 62. faze NF v kontrolni skupini z vodo in/ali topilom (največ 17 tednov). |
| 20. Biološke končne točke | Smrtnost (in nenormalen videz), čas do 62. faze NF (pri vzorcu ličink), histološka ocena ščitnice (pri vzorcu ličink), rast (teža in dolžina), jetrno-somatski indeks (pri vzorcu mladih osebkov), razmerje med genetskim/fenotipskim spolom (pri vzorcu mladih osebkov), rezultati histopatološke ocene za spolne žleze, spolne vode, ledvice in jetra (pri vzorcu mladih osebkov) ter VTG v plazmi (pri vzorcu mladih osebkov, neobvezno). |
| 21. Merila za veljavnost preskusa | Raztopljeni kisik $\geq 40\%$ vrednosti nasičenosti z zrakom; srednja temperatura vode mora biti 21 ± 1 °C, razlike med ponovljenimi vzorci in med tretiranjem pa morajo biti $< 1,0$ °C; pH preskusne raztopine mora biti med 6,5 in 8,5; smrtnost v kontroli mora biti $\leq 20\%$ pri vsakem ponovljenem vzorcu, srednji čas do 62. faze NF v kontroli mora biti ≤ 45 dni; srednja teža preskusnih organizmov pri 62. fazi NF in ob koncu preskusa v kontrolah in kontrolah s topilom (če se uporabijo) mora biti $1,0 \pm 0,2$ oziroma $11,5 \pm 3$ g; na voljo morajo biti dokazi, da so se koncentracije preskusne kemikalije v raztopini zadovoljivo vzdrževale v okviru $\pm 20\%$ srednjih izmerjenih vrednosti. |

Dodatek 4

NAČIN HRANJENJA

Opozoriti je treba, da so kljub temu priporočenemu načinu hranjenja dovoljene druge možnosti, če preskusni organizmi ustrezno hitro rastejo in se razvijajo.

Hranjenje ličink*Pripravek za prehrano ličink*

A. 1:1 (v/v) začetna hrana za postrvi: alge/TetraFin® (ali enakovredna hrana)

1. Začetna hrana za postrvi: pri visoki hitrosti mešalnika 20 sekund mešajte 50 g začetne hrane za postrvi (drobna zrnca ali prah) in 300 ml primerne filtrirane vode.
2. Mešanica alge/TetraFin® (ali enakovredna hrana): pri visoki hitrosti mešalnika 40 sekund mešajte 12 g ploščic alg spirulina in 500 ml filtrirane vode, zmešajte 12 g hrane Tetrafin® (ali enakovredne hrane) s 500 ml filtrirane vode in nato obe mešanici združite, da dobite 1 l z 12 g/l alg spirulina in 12 g/l hrane Tetrafin® (ali enakovredne hrane).
3. Zmešajte enake količine zmešane začetne hrane za postrvi in mešanice alge/TetraFin® (ali enakovredne hrane).

B. Solinski rakci:

15 ml jajčec solinskih rakcev se vali v 1 l slane vode (pripravljene tako, da se v 1 l deionizirane vode doda 20 ml NaCl). Po 24-urnem prezračevanju pri sobni temperaturi in konstantni svetlobi se solinski rakci zberejo. Na kratko se pusti, da se solinski rakci usedejo, tako da se za 30 minut ustavi prezračevanje. Ciste, ki splavajo na vrh posode, se odlijejo in zavržejo, rakci pa se pretočijo skozi ustrezne filtre in razredčijo do 30 ml s filtrirano vodo.

Protokol hranjenja

V preglednici 1 sta navedeni vrsta in količina hrane, uporabljeni med izpostavljenostjo ličink. Živali je treba od ponedeljka do petka hraniti trikrat dnevno, ob koncih tedna pa enkrat dnevno.

*Preglednica 1***Način hranjenja ličink *X. laevis* v pretočnih razmerah**

Čas (*) (po oploditvi)	Začetna hrana za postrvi: alge/TetraFin® (ali enakovredna hrana)		Solinski rakci	
	delavnik (trikrat na dan)	konec tedna (enkrat na dan)	delavnik (dvakrat na dan)	konec tedna (enkrat na dan)
4.–14. dan (v tednih 0 in 1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (od 8. do 15. dneva) 1 ml (od 16. dneva)	0,5 ml (od 8. do 15. dneva) 1 ml (od 16. dneva)
2. teden	0,67 ml	2,4 ml		
3. teden	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4. teden	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml

Čas (*) (po oploditvi)	Začetna hrana za postrvi: alge/TetraFin® (ali enakovredna hrana)		Solinski rakci	
	delavnik (trikrat na dan)	konec tedna (enkrat na dan)	delavnik (dvakrat na dan)	konec tedna (enkrat na dan)
5. teden	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
6. teden	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7. teden	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
8.–10. teden	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Dan 0 je opredeljen kot dan, ko se injicira hCG.

Prehod s prehrane za ličinke na prehrano za mlade osebke

Ko ličinke končajo preobrazbo, preidejo na prehransko formulo za mlade osebke, kot je pojasnjena spodaj. Pri tem prehodu je treba ob povečanju količine prehrane za mlade osebke količino prehrane za ličinke zmanjšati. To je mogoče doseči s sorazmernim zmanjševanjem hrane za ličinke ob sorazmernem povečevanju hrane za mlade osebke, ko vsaka skupina petih paglavcev preseže 62. fazo NF in se približa dokončanju preobrazbe v 66. fazi NF.

Hranjenje mladih osebkov

Prehrana mladih osebkov

Ko je preobrazba končana (66. faza), se način hranjenja spremeni v samo visokokakovostno tonečo hrano za žabe v velikosti 3/32 palcev (Xenopus Express™, Florida, ZDA) ali enakovredno hrano.

Pripravek iz zdrobljenih pelet za prehod s prehrane za ličinke na prehrano za mlade osebke

Peleti toneče hrane za žabe se na hitro zmeljejo v kavnem mlinčku ali mešalniku ali zdrobijo v možnarju, da se njihova velikost zmanjša za približno tretjino. Ob predolgi obdelavi nastane prah, ki pa se odsvetuje.

Protokol hranjenja

V **preglednici 2** sta navedeni vrsta in količina hrane, uporabljeni v življenjskih fazah mladih osebkov in odraslih živali. Živali je treba hraniti enkrat dnevno. Opozoriti je treba, da živali med postopkom preobrazbe še naprej prejemajo delež solinskih rakcev, dokler ni preobrazba končana pri > 95 % živali.

Na dan konca preskusa se živali ne smejo hraniti, tako da hrana ne vpliva na meritve teže.

Preglednica 2

Način hranjenja mladih osebkov *X. laevis* v pretočnih razmerah. Opozoriti je treba, da živali, ki se niso preobrazile, vključno s tistimi, pri katerih je preobrazba zakasnila zaradi tretiranja s kemikalijo, ne morejo jesti nezdobljenih peletov

Čas (*) (tedni po srednjem datumu preobrazbe)	Zdrobljeni peleti (v mg na žabico)	Celi peleti (v mg na žabico)
Ko živali končajo preobrazbo	25	0
0.–1. teden	25	28
2.–3. teden	0	110
4.–5. teden	0	165
6.–9. teden	0	220

(*) Prvi dan tedna 0 je srednji datum preobrazbe pri kontrolnih živalih.

Dodatek 5

DOLOČITEV GENETSKEGA SPOLA

Metoda določitve genetskega spola za *Xenopus laevis* temelji na Yoshimoto *et al.*, 2008. Podrobne postopke za genotipizacijo je po potrebi mogoče najti v tej publikaciji. Uporabijo se lahko tudi druge metode (npr. visokozmogljivostna qPCR), če se štejejo za primerne.

Začetna oligonukleotida *X. laevis**Označevalec DM-W*

Smerni začetni oligonukleotid: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Protismerni začetni oligonukleotid: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitivna kontrola

Smerni začetni oligonukleotid: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Protismerni začetni oligonukleotid: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Prečiščevanje DNK

DNK izolirajte iz mišičnega ali kožnega tkiva, npr. s kompletom Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat # 69 506) ali podobnim proizvodom v skladu z navodili iz kompleta. DNK se lahko spere iz centrifugiranih kolon z manj pufru, da se dobijo bolj koncentrirani vzorci, če se štejejo za potrebne za PCR. Upoštevajte, da je DNK precej stabilna, zato se je treba izogibati navzkrižni kontaminaciji, zaradi katere bi bili lahko samci napačno opredeljeni kot samice ali obratno.

PCR

V **preglednici 1** je predstavljen protokol za vzorec z uporabo JumpStart™ Taq iz Sigme.

Preglednica 1

Protokol za vzorec z uporabo JumpStart™ Taq iz Sigme

Osnovna zmes (Master Mix)	1 x (μl)	[Končna]
NFW (*)	11	–
10 x pufer	2,0	–
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (10 mM vsak)	0,4	200 μM
Označevalec za začetni oligonukleotid (8 μM)	0,8	0,3 μM
Označevalec za protismerni začetni oligonukleotid (8 μM)	0,8	0,3 μM
Kontrola za začetni oligonukleotid (8 μM)	0,8	0,3 μM
Kontrola za protismerni začetni oligonukleotid (8 μM)	0,8	0,3 μM

Osnovna zmes (Master Mix)	1 x (μl)	[Končna]
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 enot/μl
Matrična DNK	1,0	~ 200 pg/μl

(*) Voda brez nukleaze.

Opomba: Ko pripravljate osnovno zmes, pripravite dodatno količino, da upoštevate morebitne izgube, do katerih lahko pride pri pipetiranju (primer: 25 x je treba uporabiti za samo 24 reakcij).

Reakcija:

Osnovna zmes	19,0 μl
Matrica	1,0 μl
Skupaj	20,0 μl

Profil termopomnoževalnika:

1. korak	94 °C	1 min
2. korak	94 °C	30 sek
3. korak	60 °C	30 sek
4. korak	72 °C	1 min
5. korak	Pojdite na 2. korak.	35 ciklov
6. korak	72 °C	1 min
7. korak	4 °C	zadrževanje

Produkti PCR se lahko nemudoma nanesejo na gel ali pa shranijo pri 4 °C.

Agarozna gelska elektroforeza (3 %) (protokol za vzorec)

50 X TAE

Tris	24,2 g
Ledocetna kislina	5,71 ml
Na ₂ (EDTA)·2H ₂ O	3,72 g

Dodajte vodo do 100 ml.

1 X TAE

H ₂ O	392 ml
50 X TAE	8 ml

3: 1 agarozna

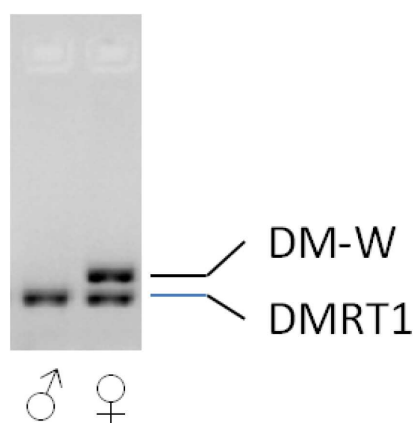
3 deli agaroze NuSieve™ GTG™

1 del agaroze Fisher z nizko elektroendoosmozo (EEO)

Metoda

1. Pripravite 3-odstotni gel, tako da v 43 ml 1 X TAE dodate 1,2 g agarozne mešanice. Premešajte, da se velike grude razpustijo.
2. Agarozno mešanico prevrte v mikrovalovni pečici, dokler se popolnoma ne razpusti (pazite, da ne bo skipela). Pustite, da se malo ohladi.
3. Dodajte 1,0 µL etidijevga bromida (10 mg/ml). Pretresite stekleničko. Upoštevajte, da je etidijev bromid mutagen, tako da je treba za ta korak, kolikor je tehnično mogoče, uporabiti druge kemikalije, da se zmanjša tveganje za zdravje delavcev⁽¹⁾.
4. Gel vlijte v kalup z glavničkom. Pustite, da se popolnoma ohladi.
5. Gel dodajte v napravo. Prekrijte ga z 1 X TAE.
6. Vsakim 10 µl produkta PCR dodajte 1 µl nanašalnega barvila (6x loading dye).
7. Vzorce s pipeto prenesite v jamice.
8. Elektroforeza ~ 20 minut poteka pri konstantni napetosti 160 voltov.

Slika agaroznega gela, na kateri so vidni vzorci prog, značilni za moški in ženski osebek, je prikazana na **sliki 1**.



Slika 1: Slika agaroznega gela, na kateri je viden vzorec proge, značilen za moški (♂) osebek (ena proga ~ 203 bp: DMRT1) in ženski (♀) osebek (dve progi pri ~ 259 bp:DM-W in 203 bp:DMRT1).

VIRI

Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T., in Ito, M. (2008). A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2 469–2 474.

⁽¹⁾ V skladu s členom 4(1) Direktive 2004/37/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 29. aprila 2004 o varovanju delavcev pred nevarnostmi zaradi izpostavljenosti rakotvornim ali mutagenim snovem pri delu (šesta posebna direktiva v skladu s členom 16(1) Direktive Sveta 89/391/EGS) (UL L 158, 30.4.2004, str. 50).

Dodatek 6

MERJENJE VITELOGENINA

Vitelogenin (VTG) se meri z metodo encimskega imunskega testa (ELISA), ki je bila prvotno razvita za VTG pri črnoglavem pisancu (Parks *et al.*, 1999). Protitelesa za *X. laevis* trenutno niso komercialno dostopna. Vendar je glede na obilico informacij za ta protein in razpoložljivost stroškovno učinkovitih komercialnih storitev za izdelavo protiteles razumno, da lahko laboratoriji zlahka razvijejo ELISA za to merjenje (Olmstead *et al.*, 2009). Tudi Olmstead *et al.* (2009) zagotavljajo opis testa, kot je prilagojen za VTG pri *X. tropicalis*, kot je prikazano v nadaljevanju. Pri metodi se uporablja protitelo, izdelano za VTG *X. tropicalis*, vendar je znano, da deluje tudi pri VTG *X. laevis*. Opozoriti je treba, da je mogoče uporabiti tudi nekonkurenčne teste ELISA in da imajo lahko ti nižje meje zaznavnosti kot spodaj opisana metoda.

Pribor in reagenti

- Serum predabsorbiranega 1. protitelesa
- En del seruma 1. protitelesa proti VTG *X. tropicalis* zmešajte z dvema deloma plazme kontrolnih samcev in pustite pri sobni temperaturi ~ 75 minut, dajte na led za 30 minut, centrifugirajte > 20 K x G 1 uro pri 4 °C, odstranite supernatant, alikvot, shranite pri -20 °C.
- 2. protitelo
- HRP konjugat kozjih protikunčjih protiteles IgG (npr. Bio-Rad 172-1019)
- Standard VTG
- prečiščeni VTG *X. laevis* pri 3,3 mg/ml.
- TMB (3,3',5,5' tetrametil-benzidin) (npr. KPL 50-76-00; ali Sigma T0440)
- Normalni kozji serum (NGS)(npr. Chemicon® S26-100 ml)
- Polistirenske 96-jamične mikrotitrne plošče za encimskim imunski test (npr. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35)
- Hibridizacijska pečica pri 37 °C (ali inkubator s hitrim uravnavanjem pogojev) za plošče, vodna kopel za epruvete
- Druga običajna laboratorijska oprema, kemikalije in pribor

Recepti

Premazni pufer (50 mM karbonatni pufer, pH 9,6):

NaHCO ₃	1,26 g
Na ₂ CO ₃	0,68 g
voda	428 ml

10x PBS (0,1 M fosfata, 1,5 M NaCl):

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,83 g
Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O	20,1 g
NaCl	71 g
voda	810 ml

Pufer za spiranje (PBST):

10x PBS	100 ml
voda	900 ml

Vrednost pH prilagodite na 7,3 z 1 M HCl, nato dodajte 0,5 ml Tween-20.

Analizni pufer:

normalni kozji serum (NGS)	3,75 ml
pufer za spiranje	146,25 ml

Odvzem vzorcev

Kri se odvzame s heparinizirano mikrohematokritsko cevko in postavi na led. Po triminutnem centrifugiranju se cevka zareže in prelomi, plazma pa se iztisne v 0,6-mililitrske mikrocentrifugirke, ki vsebujejo 0,13 enote liofiliziranega aprotinina. (Te mikrocentrifugirke se pripravijo vnaprej, tako da se doda ustrezna količina aprotinina, nato se zamrznejo in liofilizirajo v vakuumskem koncentradorju pri nizki temperaturi, dokler niso suhe.) Plazmo do analize hranite pri -80 °C.

Postopek za eno ploščo

Prekrivanje plošče

Zmešajte 20 µl prečiščenega VTG z 22 ml karbonatnega pufra (končni 3 µg/ml). V vsako jamico na 96-jamični plošči dodajte 200 µl. Ploščo prekrijte z lepilnim tesnilnim filmom in pustite dve uri inkubirati pri 37 °C (ali čez noč pri 4 °C).

Blokiranje plošče

Blokirna raztopina se pripravi tako, da se 2 ml normalnega kozjega seruma (NGS) doda v 38 ml karbonatnega pufra. Odstranite prekrivno raztopino in osušite. V vsako jamico dodajte 350 µl blokirne raztopine. Prekrijte z lepilnim tesnilnim filmom in dve uri inkubirajte pri 37 °C (ali čez noč pri 4 °C).

Priprava standardov

5,8 µl standarda prečiščenega VTG se zmeša z 1,5 ml analiznega pufra v 12 x 75-milimetrski epruveti iz borosilikatnega stekla za enkratno uporabo. S tem se pridobi 12 760 ng/ml. Nato se opravi zaporedno redčenje, tako da se doda 750 µl predhodne razredčine v 750 µl analiznega pufra, da se dobijo končne koncentracije 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 in 50 ng/ml.

Priprava vzorcev

Začnite z razredčino 1: 300 (npr. zmešajte 1 μ l plazme z 299 μ l analiznega pufra) ali 1: 30 plazme v analiznem pufru. Če se pričakuje velika količina VTG, bodo morda potrebne dodatne ali večje razredčine. B/B₀ poskušajte ohraniti v območju standardov. Za vzorce brez znatnega VTG, npr. kontrolne samce in samice (ki so vsi nezreli), uporabite razredčino 1: 30. Manj razredčeni vzorci lahko pokažejo neželene učinke matrice.

Poleg tega je priporočljivo, da se na vsaki plošči izvede pozitivna kontrola. Vzorec za kontrolo je pridobljen iz plazme, ki vsebuje visoke ravni VTG. Plazma se najprej razredči v NGS, razdeli v alikvote in shrani pri -80°C . Za vsako ploščo se alikvot odtaja, nadalje razredči v analiznem pufru in uporabi podobno kot preskusni vzorec.

Inkubacija s 1. protitelesom

Prvo protitelo se pripravi tako, da se serum predabsorbiranega 1. protitelesa razredči v razmerju 1: 2000 v analiznem pufru (npr. 8 μ l v 16 ml analiznega pufra). V stekleni epruveti zmešajte 300 μ l raztopine 1. protitelesa s 300 μ l vzorca/standarda. Epruveta B₀ se pripravi podobno s 300 μ l analiznega pufra in 300 μ l protitelesa. Pripravi je treba tudi epruveto NSB samo z uporabo 600 μ l analiznega pufra, tj. brez protiteles. Epruvete prekrijte s parafilmom in nežno obračajte, da se premešajo. Eno uro inkubirajte v vodni kopeli pri 37°C .

Spiranje plošče

Tik pred končano inkubacijo 1. protitelesa ploščo sperite. To se stori tako, da se vsebina strese iz plošče, plošča pa osuši z vpojnim papirjem. Jamice najprej napolnite s 350 μ l raztopine za spiranje, nato pa to izlijte in jamice osušite. Pri tem je koristna večkanalna pipeta ali spiralnik za plošče. Ta korak spiranja se ponovi še dvakrat za skupaj tri spiranja.

Nanos na ploščo

Ko je plošča sprana, vzemite epruvete iz vodne kopeli in jih nežno zavrtite. V dvojne jamice na plošči dodajte 200 μ l iz vsake epruvete z vzorcem, standardom, B₀ in NSB. Ploščo prekrijte z lepilnim tesnilnim filmom in pustite eno uro inkubirati pri 37°C .

Inkubacija z 2. protitelesom

Po koncu inkubacije iz prejšnjega koraka je treba ploščo znova trikrat sprati, kot je navedeno zgoraj. Razredčina 2. protitelesa se pripravi tako, da se 2,5 μ l 2. protitelesa zmeša s 50 ml analiznega pufra. V vsako jamico dodajte 200 μ l razredčine 2. protitelesa in eno uro inkubirajte pri 37°C .

Dodajanje substrata

Ko je inkubacija z 2. protitelesom končana, ploščo trikrat sperite, kot je opisano zgoraj. Nato v vsako jamico dodajte 100 μ l substrata TMB. Pustite, da reakcija poteka 10 minut, po možnosti ne na svetlobi. Ustavite reakcijo, tako da dodate 100 μ l 1 M fosforjeve kisline. S tem se bo barva spremenila z modre na živo rumeno. Z uporabo čitalca plošče izmerite absorbanco pri 450 nm.

Izračun B/B₀

Odštejte povprečno vrednost NSB od vseh meritev. B/B₀ za vsak vzorec in standard se izračuna z delitvijo vrednosti absorbance (B) s povprečno absorbanco vzorca B₀.

Pridobitev standardne krivulje in določitev neznanih količin

Izdelajte standardno krivuljo s pomočjo računalniške programske opreme za izdelavo grafov (npr. Slidewrite™ ali Sigma Plot®), ki bo ekstrapolirala količino iz B/B₀ vzorca na podlagi B/B₀ standardov. Vrednosti, izrisane na logaritemski skali, običajno oblikujejo sigmoidno krivuljo. Lahko pa se pokažejo kot linearne, če se uporabi ozko območje standardov. Popravite količine vzorcev glede na faktor redčenja in navedite kot mg VTG/ml plazme.

Določitev minimalnih meja zaznavnosti (MDL)

Pogosto, zlasti pri normalnih samcih, ne bo jasno, kako poročati o rezultatih pri nizkih vrednostih. V takih primerih je treba uporabiti 95-odstotne 'meje zaupanja', da se določi, ali je treba vrednost navesti kot nič ali kot neko drugo število. Če je rezultat vzorca v intervalu zaupanja ničelnega standarda (B_0), je treba rezultat navesti kot nič. Minimalna meja zaznavnosti bo najnižji standard, ki se dosledno razlikuje od ničelnega standarda; tj. intervala zaupanja se ne prekrivata. Za vsak rezultat vzorca, ki je v okviru meje zaupanja minimalne ravni zaznavnosti ali nad njo, se navede izračunana vrednost. Če vzorec spada med ničelni standard in intervale zaupanja minimalne ravni zaznavnosti, je treba za vrednost tega vzorca navesti polovico minimalne ravni zaznavnosti.

VIRI

Olmstead, A. W., Korte, J. J., Woodis, K. K., Bennett, B. A., Ostazeski, S., in Degitz, S. J. (2009). Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117–123.

Parks, L. G., Cheek, A. O., Denslow, N. D., Heppell, S. A., McLachlan, J. A., LeBlanc, G. A., Sullivan, C. V. (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 123: 113–125.

Dodatek 7

STATISTIČNA ANALIZA

S preskusom LAGDA se pridobijo tri oblike podatkov, ki jih je treba statistično analizirati: (1) kvantitativni kontinuirani podatki, (2) podatki o času do dogodka za razvojne stopnje (tj. čas do 62. faze NF) in (3) ordinalni podatki v obliki ocen resnosti ali razvojnih faz iz histopatoloških ocen. Priporočeno drevo odločanja za statistično analizo za preskus LAGDA je prikazano na sliki 1. Prav tako so v nadaljevanju navedene nekatere opombe, ki bodo morda potrebne za izvedbo statistične analize meritev iz preskusa LAGDA. Pri drevesu odločanja za analizo je treba rezultate meritev za smrtnost, rast (teža in dolžina) in jetrno-somatski indeks (LSI) analizirati v skladu z vejo „Druge končne točke“.

Kontinuirani podatki

Pri podatkih za kontinuirane končne točke je treba najprej preveriti monotonost s transformacijo podatkov z rangi, prilagoditvijo modelu ANOVA ter primerjavo linearnih in kvadratnih kontrastov. Če so podatki monotoni, je treba izvesti regresijski trendni test po Jonckheere-Terpstraju na medianah ponovljenih vzorcev, pri čemer nadaljnja analiza ni potrebna. Druga možnost za podatke, ki so normalno porazdeljeni s homogenimi variancami, je regresijski Williamsov test. Če podatki niso monotoni (kvadratni kontrast je statistično značilen, linearni kontrast pa ne), jih je treba analizirati z uporabo mešanega modela ANOVA. Pri podatkih je nato treba oceniti normalnost (priporoča se uporaba Shapiro-Wilkovega ali Anderson-Darlingovega testa) in homogenost varianc (priporoča se uporaba Levenejevega testa). Oba testa se izvedeta na ostankih iz mešanega modela ANOVA. Namesto teh formalnih testov za normalnost in homogenost varianc se lahko uporabi strokovna presoja, čeprav se priporoča uporaba formalnih testov. Če so podatki normalno porazdeljeni s homogenostjo varianc, so izpolnjene predpostavke mešanega modela ANOVA in se znaten učinek tretiranja določi na podlagi Dunnettovega testa. Če je ugotovljena nenormalnost ali heterogenost varianc, potem predpostavke Dunnettovega testa niso izpolnjene in je treba poiskati normalizacijsko pretvorbo, ki stabilizira variance. Če take pretvorbe ni mogoče najti, se znaten učinek tretiranja določi z Dunnovim testom. Kjer je mogoče, je treba opraviti enostranski test, ne dvostranskega testa, vendar je za določitev, kateri je primeren za določeno končno točko, potrebna strokovna presoja.

Smrtnost

Podatke o smrtnosti je treba analizirati za obdobje, ki zajema celoten preskus, in jih izraziti kot delež osebkov, ki so poginili v posameznem akvariju. Paglavci, ki preobrazbe ne končajo v določenem časovnem okviru, paglavci, ki so v kohorti podvzorcev ličink, mlade žabe, ki so izločene, in vse živali, ki poginejo zaradi napake pri poskusu, je treba obravnavati kot cenzurirane podatke in se ne smejo vključiti v imenovalec izračuna odstotka. Pred kakršno koli statistično analizo je treba deleže smrtnosti pretvoriti z arkus-sinus-kvadratnokorensko transformacijo. Druga možnost je, da se uporabi regresijski Cochran-Armitageev test, po možnosti z Rao-Scottovo prilagoditvijo v primeru nadrazpršenosti.

Teža in dolžina (podatki o rasti)

Samci in samice med preobrazbo niso spolno dimorfni, zato je treba podatke o rasti na podlagi podvzorcev ličink analizirati neodvisno od spola. Vendar pa je treba podatke o rasti mladih osebkov analizirati ločeno na podlagi genetskega spola. Za te končne točke bo morda potrebna logaritemska transformacija, saj logaritemsko normalna porazdelitev podatkov o velikosti ni neobičajna.

Jeterno-somatski indeks (LSI)

Teže jeter je treba normalizirati kot deleže tež celotnega telesa (tj. LSI) in analizirati ločeno na podlagi genetskega spola.

Čas do 62. faze NF

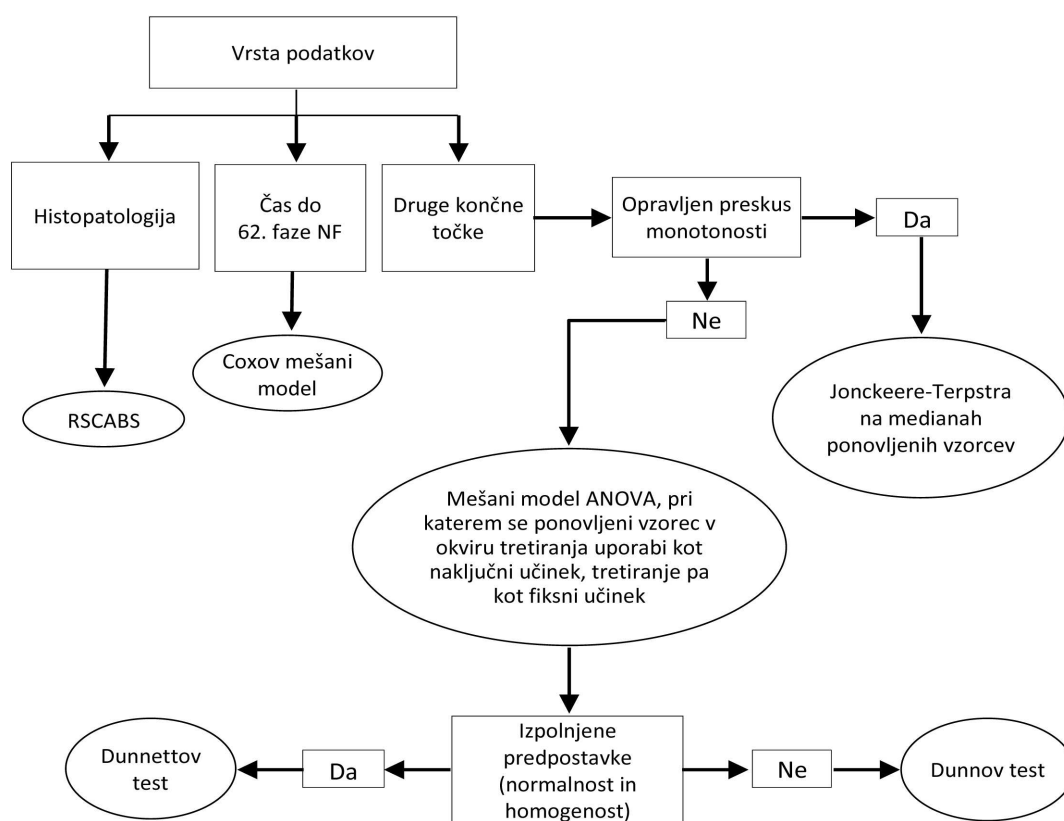
Podatke o času do preobrazbe je treba obravnavati kot podatke o času do dogodka, pri čemer se vsi pogini ali osebki, ki niso dosegli 62. faze NF v 70 dneh, obravnavajo kot desno cenzurirani podatki (tj. prava vrednost je večja od 70 dni, vendar se študija konča, preden so živali dosegle 62. fazo NF v 70 dneh). Za določitev datuma končanja preskusa je treba uporabiti srednji čas do končanja preobrazbe v 62. fazi NF v kontrolah z vodo za redčenje. Srednji čas do končanja preobrazbe je mogoče določiti s Kaplan-Meierjevimi cenilkami. To končno točko je treba analizirati z uporabo mešanega Coxovega modela sorazmernih tveganj, pri katerem se upošteva ponovitevna struktura študije.

Histopatološki podatki (ocene resnosti in razvojne faze)

Histopatološki podatki so v obliki ocen resnosti ali razvojnih faz. Test, imenovan RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices), uporablja regresijski Cochran-Armitageev trendni test z Rao-Scottovo prilagoditvijo na vsaki stopnji resnosti v histopatološkem odzivu (Green *et al.*, 2014). Z Rao-Scottovo prilagoditvijo je v test vključen načrt poskusa s ponovljenimi posodami. Postopek 'by Slices' vključuje biološko pričakovanje, da se resnost učinka običajno poveča s povečanjem odmerkov ali koncentracij, pri čemer se ohranijo individualne ocene osebkov in razkrije resnost kakršnega koli ugotovljenega učinka. S postopkom RSCABS se ne samo določi, katera tretiranja se statistično razlikujejo od kontrol (tj. imajo težjo patologijo kot kontrole), ampak se določi tudi, pri kateri oceni resnosti nastopi razlika, s čimer se zagotovi zelo potreben kontekst za analizo. V primeru določitve razvojne faze spolnih žlez in spolnih vodov je treba za podatke uporabiti dodatno manipulacijo, ker je predpostavka RSCABS, da se resnost učinka povečuje z odmerkom. Opaženi učinek je lahko zakasnel ali prehiter razvoj. Podatke o določitvi razvojne faze je torej treba analizirati takoj, ko so zbrani, da se odkrije pospešitev razvoja, in nato ročno transformirati pred drugo analizo, da se zazna zakasnitev v razvoju.

Slika 1

Drevo odločanja za statistično analizo podatkov preskusa LAGDA



VIRI

Green, J. W., Springer, T. A., Saulnier, A. N., in Swintek, J. (2014). Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1 108–1 116.

Dodatek 8

PREUDARKI ZA ODKRIVANJE IN ZMANJŠEVANJE POJAVA SKOLIOZE

Zaradi idiopatske skolioze, ki so običajno kaže kot „ukrivljen rep“ pri paglavcih *Xenopus laevis*, se lahko morfološka in vedenjska opažanja pri preskusnih populacijah zapletejo. Zato si je treba prizadevati, da bi se pojavnost skolioze tako v staležu kot tudi v preskusnih pogojih čim bolj zmanjšala ali odpravila. Pri končnem preskusu je priporočljivo, da je prevalenca zmerne in hude skolioze manj kot 10-odstotna, zaradi izboljšanja zaupanja, da se lahko s preskusom odkrijejo s tretiranjem povezani učinki na razvoj sicer zdravih ličink dvoživk.

Pri dnevnih opažanjih med končnim preskusom je treba evidentirati pojavnost (štetje posameznih osebkov) in resnost skolioze, kadar je prisotna. Naravo nenormalnosti je treba opisati glede na mesto (npr. pred zadnjično odprtino ali za njo) in smer ukrivljenosti (npr. vstran ali od hrbtnege dela proti trebušnemu delu). Resnost se lahko oceni kot:

(NO) neopazna: ukrivljenost ni prisotna;

(1) *minimalna*: rahla ukrivljenost vstran za zadnjično odprtino; opazna samo pri mirovanju;

(2) *zmerna*: ukrivljenost vstran za zadnjično odprtino; vedno vidna, vendar ne ovira gibanja;

(3) *huda*: ukrivljenost vstran pred zadnjično odprtino; ALI vsaka ukrivljenost, ki ovira gibanje; ALI ukrivljenost od hrbtnege proti trebušnemu delu.

Znanstveno-svetovalni odbor US EPA FIFRA (FIFRA SAP 2013) je pregledal zbirne podatke za skoliozo pri petnajstih preskusih preobrazbe dvoživk pri *X. laevis* (51. faza NF do 60+) in zagotovil splošna priporočila za zmanjšanje prevalence te nenormalnosti pri preskusnih populacijah. Za preskus LAGDA so ta priporočila ustrezna, čeprav je z njim zajeto daljše razvojno obdobje.

Pretekla uspešnost mrestenja

Na splošno je treba kot pare za razmnoževanje uporabiti visokokakovostne zdrave odrasle osebkove; z izločitvijo parov za razmnoževanje, katerih potomci imajo skoliozo, se lahko zmanjša njeno pojavljanje skozi čas. Zlasti je treba čim bolj zmanjšati uporabo živali za razmnoževanje, ujetih v naravnem okolju. Obdobje izpostavljenosti v preskusu LAGDA se začne z zarodki v 8–10. fazi NF, zato na začetku preskusa ni mogoče določiti, ali se bo pri zadevnih osebkih pokazala skolioza. Poleg sledenja pojavnosti skolioze pri živalih, ki so vključene v preskus, je torej treba dokumentirati preteklo uspešnost izvalitve (vključno s prevalenco skolioze pri vseh ličinkah, ki so se lahko razvile). Morda bo koristno nadalje spremljati delež vsake izvalitve, ki ni bil uporabljen v zadevni študiji, in poročati o teh opažanjih (FIFRA SAP 2013).

Kakovost vode

Pri laboratorijskem staležu in med preskusom je treba zagotoviti ustrezno kakovost vode. Poleg meril kakovosti vode, ki se redno ocenjujejo za preskuse toksičnosti za vodno okolje, je lahko koristno spremljati in odpraviti kakršna koli pomanjkanja hranilnih snovi (npr. pomanjkanje vitamina C, kalcija, fosforja) ali presežne ravni selena in bakra, za katere se poroča, da povzročajo različne stopnje skolioze pri laboratorijsko gojenih *Rana* sp. in *Xenopus* sp. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; kot je navedeno v FIFRA SAP 2013). Kakovost vode in zdravje preskusnih osebkov se bosta na splošno izboljšala z uporabo ustrezne prehrane (glej Dodatek 4) in rednim čiščenjem akvarija.

Prehrana

Posebna priporočila za prehrano, za katero je bilo v preskusu LAGDA ugotovljeno, da je uspešna, so podrobno navedena v Dodatku 4. Priporočljivo je, da se viri hrane pregledajo glede bioloških toksinov, herbicidov in drugih pesticidov, za katere je znano, da povzročajo skoliozo pri *X. laevis* ali drugih vodnih živalih (Schlenk in Jenkins 2013). Izpostavljenost nekaterim inhibitorjem holinesteraze je bila na primer povezana s skoliozo pri ribah (Schultz *et al.* 1985) in žabah (Bacchetta *et al.* 2008).

VIRI

Bacchetta, R., Mantecca, P., Andrioletti, M., Vismara, C., in Vailati, G. (2008). Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment* 392: 110–118.

Schultz, T. W., Dumont, J. N., in Epler, R. G. (1985). The embryotoxic and osteolathrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185–198.

Leibovitz, H. E., Culley, D. D., in Geaghan, J. P. (1982). Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 13: 322–328.

Marshall, G. A., Amborski, R. L., in Culley, D. D. (1980). Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 11: 445–453.

Martinez, I., Alvarez, R., Herraiz, I., in Herraiz, P. (1992). Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. *Anatomical Records* 233(2): 314–320.

Schlenk, D., in Jenkins, F. (2013). Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. 21.–23. maj, 2013. Washington, DC.
